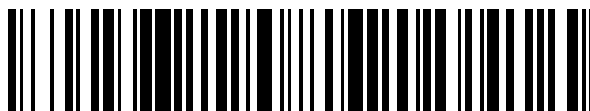


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 042**

51 Int. Cl.:

A01H 3/00 (2006.01)

A01H 3/02 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/CA2015/050644**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16004536**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15819391 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3167057**

54 Título: **Modificación de la producción de proteínas en plantas**

30 Prioridad:

11.07.2014 US 201462023718 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.10.2020

73 Titular/es:

**MEDICAGO INC. (50.0%)
1020 route de l'Eglise Suite 600
Québec, Québec G1V 3V9, CA y
UNIVERSITÉ LAVAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MICHAUD, DOMINIQUE;
PEPIN, STEEVE;
ETHIER, GILBERT;
GOULET, MARIE-CLAIRE;
GAUDREAU, LINDA;
GAGNE, MARIELLE;
MARTEL, MICHELE;
BECHTOLD, NICOLE;
D'AOUST, MARC-ANDRE y
GOSSELIN, ANDRE**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 787 042 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modificación de la producción de proteínas en plantas

5 Campo de invención

La presente invención se refiere a métodos para producir proteínas en plantas. La presente invención también proporciona métodos para aumentar la producción de una o más proteínas en plantas.

10 Antecedentes de la invención

15 Las plataformas de expresión de proteínas basadas en plantas son una respuesta útil a la creciente demanda de productos biológicos terapéuticos y de diagnóstico en todo el mundo. Las células vegetales, a diferencia de las bacterias o las levaduras, pueden pegar, ensamblar y modificar correctamente proteínas complejas de origen mamífero, tales como anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico. Las plantas también presentan ventajas en términos de seguridad, inversión de capital y facilidad de escalado en comparación con los sistemas de producción basados en células de mamíferos.

20 Por lo tanto, las plantas son huéspedes adecuados para la producción de proteínas que tienen aplicaciones actuales en las ciencias de la vida tales como, por ejemplo, AcM o antígenos virales tales como HA de influenza.

25 El documento WO 07016276 describe un método para la transformación estable de plantas mediante el corte de una plántula en el punto donde los dos cotiledones se encuentran para eliminar ambos cotiledones y las hojas verdaderas iniciales y permitir la aparición de un nuevo brote de la superficie cortada. Este método implica hacer una herida en la planta para facilitar la introducción de *Agrobacterium* en el sitio de la herida y aumentar la eficiencia de la transformación. Las plántulas cortadas se agitan con agitador vorticial en una suspensión de la bacteria, que comprende un plásmido de transformación que transporta el ADN de transferencia deseado. La etapa de hacer la herida se necesita antes de la etapa de transformación. La transformación precisa mediada por corte puede dar como resultado la transformación estable de nuevos brotes que surgen de la superficie cortada de las plántulas. Estos brotes pueden desarrollarse en las partes aéreas de una planta y, en consecuencia, dar lugar a progenies transformadas.

30 Spokevicus y otros (Functional Plant Biology 2006) describen la transformación *in vivo* de yemas laterales latentes (DLB) en árboles *Populus*. Las heridas en las DLB se hicieron mediante un corte vertical central o la parte superior de las plantas se eliminó y las DLB restantes se trataron con una combinación de corte vertical, adición de cobertura protectora o adición de *A. tumefaciens*. Con este método, la etapa de hacer la herida se necesita antes de la etapa de transformación.

35 El documento WO 2008/151444 describe un método para sintetizar una proteína de interés dentro de una planta con el uso de un sistema de expresión transitoria. Las plantas se podaron antes de la infiltración de la construcción de ácido nucleico deseada. Las yemas apicales y axilares de plantas de *N. benthamiana* se eliminaron mecánicamente de las plantas por despunte, o se podaron químicamente antes de la infiltración al vacío de las hojas, con cepas de *Agrobacterium* transformadas con plásmidos apropiados.

40 Wydro y otros 2006 (Acta Biochimica Polonica, Vol 53 núm. 2/2006 289-298) describen que el nivel más alto de expresión transitoria del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) se detecta en las hojas más jóvenes (ubicadas en la parte superior de la planta) de *N. benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens*, mientras que la expresión en las hojas más viejas, localizadas en la posición intermedia e inferior, es más baja. Halfhill y otros (Plant Cell Rep 22: 338-343, 2003) sugirieron que los cambios en la fluorescencia de GFP estaban relacionados con cambios en la concentración de proteínas solubles durante el envejecimiento de la hoja. El nivel de expresión génica de *gfp* y la concentración de proteínas solubles disminuyeron en tiempos similares y en grados similares en hojas individuales en diferentes posiciones. Wydro y otros sugieren que la estrecha relación entre estos dos factores sugeriría que la disminución en la expresión de GFP fue el resultado de cambios generales en la fisiología de la hoja.

45 La expresión de proteínas clínicamente útiles en plantas se ha reforzado por el desarrollo de sistemas de alto rendimiento para la expresión transitoria de proteínas con el uso de agroinfiltración. Existe la necesidad de optimizar la expresión y aumentar la cantidad y calidad de las proteínas recombinantes en las plantas.

55 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir proteínas en plantas. También se describen métodos para aumentar la producción de una o más proteínas en plantas.

60

Es un objetivo de la invención proporcionar un método mejorado para producir proteínas en plantas.

La presente invención proporciona un método para producir una proteína de interés que comprende:

65 a) tratar una planta o parte de una planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias en donde el tratamiento comprende aumentar la duración de la luz durante el crecimiento de la planta, aumentar la intensidad de luz durante

el crecimiento de la planta, cultivar la planta en presencia de una hormona, o una combinación de los mismos, para producir una planta o una parte de la planta tratada;

5 b) introducir uno o más de un ácido nucleico en la planta o parte de la planta, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés, la secuencia de nucleótidos se encuentra unida operativamente a una región reguladora que es activa en la planta;

10 c) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés para aumentar así el rendimiento de la proteína de interés, en comparación con el rendimiento de la proteína de interés obtenida del tejido vegetal de una planta similar que se cultiva en las mismas condiciones, pero que no se ha tratado para aumentar la biomasa de hojas secundarias,

15 en donde la etapa de tratamiento, etapa a), se realiza desde aproximadamente 40 días antes de la etapa de introducción, etapa b), hasta aproximadamente 9 días antes de la etapa de introducción, etapa b).

La proteína de interés que puede usarse en el método como se describió anteriormente, puede ser un anticuerpo, un antígeno, una vacuna o una enzima. La proteína de interés puede ser una proteína HA de influenza y la HA puede formar una partícula tipo virus de la influenza (VLP) cuando se expresa en la planta o parte de la planta.

20 El uno o más de un ácido nucleico puede introducirse en la planta o parte de la planta que tiene una relación de biomasa secundaria respecto a biomasa de hojas primarias de entre 0,2:1 y 3:1.

25 La presente invención también proporciona el método como se describió anteriormente, en donde la etapa de tratamiento de la planta o parte de la planta, etapa a), se lleva a cabo desde aproximadamente 20 días antes de la etapa de introducción del uno o más de un ácido nucleico hasta 9 días antes de la etapa de introducción del uno o más de un ácido nucleico. También se describe un método en donde la etapa de tratamiento de la planta, etapa a), comprende aumentar la duración de la luz durante el crecimiento de la planta, aumentar la intensidad de luz durante el crecimiento de la planta, seleccionar las longitudes de onda a las que se expone una planta durante el crecimiento, podar la yema apical del tallo primario de la planta, cultivar la planta en presencia de un agente, una hormona o una combinación de los mismos, que aumenta el desarrollo de brotes secundarios, aplicar un compuesto químico que reduce la dominancia apical, poda mecánica, poda química, modificación genética por inserción, desactivación génica y fitomejoramiento para fomentar el crecimiento secundario, o una combinación de los mismos.

35 En el método descrito anteriormente la planta puede cultivarse en presencia de una fitohormona. Por ejemplo, la planta puede cultivarse en presencia de aproximadamente 50 ppm a 900 ppm de fitohormona. La fitohormona puede ser una citoquinina sintética, por ejemplo, 6-bencilaminopurina (BAP).

40 La presente invención también incluye el método descrito anteriormente en donde el método comprende además una etapa d) de cosechar la planta o parte de la planta, y opcionalmente, purificar la proteína de interés. Durante la etapa de cosecha, pueden cosecharse las hojas secundarias, o las hojas primarias y las hojas secundarias. Además, pueden cosecharse hojas secundarias, hojas intermedias de tallos primarios (P2) y hojas jóvenes de tallos primarios (PI), o pueden cosecharse hojas intermedias de tallos primarios (P2), hojas jóvenes de tallos primarios (PI), hojas viejas de tallos secundarios (S3), hojas intermedias de tallos secundarios (S2) y hojas jóvenes de tallos secundarios (S1). Además, las hojas viejas (P3) de los tallos primarios de la planta pueden excluirse de la cosecha.

45 En la etapa de introducción, etapa b), el ácido nucleico puede expresarse de manera transitoria en la planta o el ácido nucleico se expresa de manera estable en la planta.

50 Al aumentar la biomasa de hojas secundarias puede obtenerse un aumento en el rendimiento de proteínas de la biomasa primaria y secundaria en comparación con el rendimiento de la proteína de interés obtenida del mismo tejido vegetal de una planta que no se ha tratado para aumentar la biomasa secundaria y cultivado en las mismas condiciones.

Este sumario de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

55 Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos en donde:

60 La Figura 1 muestra la producción de biomasa de plantas cultivadas en un invernadero antes de la infiltración bajo diferentes fotoperiodos de luz (16 h y 24 h) y tratamientos de intensidad de luz (80 y 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$). Se cosecharon hojas jóvenes (PI), maduras (P2) y viejas (P3) del tallo principal y hojas jóvenes (S1), maduras (S2) y viejas (S3) de los tallos secundarios y se determinó la biomasa.

65 La Figura 2 muestra la producción de HA en hojas jóvenes (PI), maduras (P2) y viejas (P3) del tallo principal y hojas jóvenes (S1), maduras (S2) y viejas (S3) de los tallos secundarios bajo diferentes fotoperiodos de luz (16 h y 24 h) y

tratamientos de intensidad de luz (80 y 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$).

La Figura 3 muestra el rendimiento total de HA (HA por planta) en hojas jóvenes (PI), maduras (P2) y viejas (P3) del tallo principal y hojas jóvenes (S1), maduras (S2) y viejas (S3) de los tallos secundarios bajo diferentes fotoperiodos de luz (16 h y 24 h) y tratamientos de intensidad de luz (80 y 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$).

La Figura 4 muestra el rendimiento total de HA en las hojas del tallo principal (parte inferior (P)) y las hojas de los tallos secundarios (parte superior (S)) bajo diferentes fotoperiodos de luz (16 h y 24 h) y tratamientos de intensidad de luz (80 y 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$).

La Figura 5 muestra la producción de biomasa de plantas cultivadas en una cámara de cultivo, ya sea con intensidad de luz baja o luz alta. Se cosecharon hojas jóvenes (P1), maduras (P2) y viejas (P3) del tallo principal y hojas jóvenes (S1), maduras (S2) y viejas (S3) de los tallos secundarios y se determinó la biomasa.

La Figura 6 muestra el rendimiento total de HA por planta cultivada en una cámara de cultivo, ya sea con intensidad de luz baja o luz alta. Se cosecharon hojas jóvenes (PI), maduras (P2) y viejas (P3) del tallo principal y hojas jóvenes (S1), maduras (S2) y viejas (S3) de los tallos secundarios y se determinó el rendimiento total de HA por planta.

La Figura 7 muestra un diagrama esquemático de una planta con hojas primarias (PI, P2, P3) y secundarias (S1, S2, S3).

La Figura 8 muestra el efecto de la poda, en este caso la eliminación de la yema apical de las plantas 5, 7 o 12 días después del trasplante de las plántulas, sobre la biomasa primaria total (P) frente a la biomasa secundaria total (S) por planta.

La Figura 9 muestra el efecto de la 6-bencilaminopurina (BAP) sobre la biomasa primaria total (P) frente a la biomasa secundaria total (S), para plantas tratadas con bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 100, 500 o 1000 ppm, 7 y/o 12 días después del trasplante de las plántulas.

La Figura 10 muestra la tasa media de producción de HA (unidades de HA por g de peso fresco) en plantas tratadas con 6-bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 100, 500 o 1000 ppm, 7 y/o 12 días después del trasplante de las plántulas.

La Figura 11 muestra el rendimiento total de HA (HA por planta) en plantas tratadas con 6-bencilaminopurina (BAP) a una concentración de 100, 500 o 1000 ppm, 7 y/o 12 días después del trasplante de las plántulas.

Las Figuras 12A y 12B muestran los cebadores IF-PDI.S1+3c (SEQ ID NO: 1) e IF-H1cTMCT.S1-4r (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

La Figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos de PDISP/H1 California (SEQ ID NO:3).

La Figura 14 muestra una representación esquemática de la construcción 1191

La Figura 15 muestra la secuencia de nucleótidos de la construcción 1191 (SEQ ID NO:4). Los límites de ADN-t están subrayados.

La Figura 16 muestra la secuencia de nucleótidos del casete de expresión 484. La secuencia que codifica PDISP/H1 California está subrayada.

La Figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos de PDISP/H1 California (SEQ ID NO:6)

La Figura 18 muestra una representación esquemática de la construcción número 484 (2X35S/CPMV HT)

Descripción detallada

La presente invención se refiere a métodos para producir proteínas en plantas, en particular, a métodos para la producción de proteínas de interés en plantas. También se describe un método para producir una proteína de interés dentro de una planta o una parte de una planta.

La presente invención proporciona un método para producir una proteína de interés que comprende:

a) tratar una planta o parte de una planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias en donde el tratamiento comprende aumentar la duración de la luz durante el crecimiento de la planta, aumentar la intensidad de luz durante el crecimiento de la planta, cultivar la planta en presencia de una hormona, o una combinación de los mismos, para producir una planta o una parte de la planta tratada;

b) introducir uno o más de un ácido nucleico en la planta o parte de la planta, el ácido nucleico comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés, la secuencia de nucleótidos se encuentra unida operativamente a una región reguladora que es activa en la planta;

5 c) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés, para aumentar así el rendimiento de la proteína de interés, en comparación con el rendimiento de la proteína de interés obtenida del tejido vegetal de una planta similar que se cultiva en las mismas condiciones, pero que no se ha tratado para aumentar la biomasa secundaria,

10 en donde la etapa de tratamiento, etapa a), se realiza desde aproximadamente 40 días antes de la etapa de introducción, etapa b), hasta aproximadamente 9 días antes de la etapa de introducción, etapa b).

15 El tejido vegetal puede cosecharse, y la proteína de interés puede extraerse de la planta. Si se desea, la proteína de interés puede purificarse con el uso de técnicas estándar que se conocen bien en la técnica. Alternativamente, la planta puede cosecharse y usarse como alimento, nutriente o suplemento médico o la planta puede procesarse parcialmente para producir un extracto vegetal mínimamente procesado para el uso como alimento, nutriente o suplemento médico.

Por una "planta similar" se entiende una planta del mismo género, especie y variedad que la planta tratada para aumentar la producción de biomasa secundaria.

20 El uno o más de un ácido nucleico puede introducirse en la planta o parte de la planta cuando la relación de la biomasa de hojas secundarias respecto a la biomasa de hojas primarias está entre 0,2:1 y 3:1 o cualquier relación intermedia. Por ejemplo, la relación entre la biomasa de hojas secundarias respecto a la biomasa de hojas primarias puede ser de aproximadamente 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,2:1, 1,4:1, 1,6:1, 1,8:1, 2:1, 2,2:1, 2,4:1, 2,6:1, 2,8:1, 3:1 o cualquier relación intermedia.

25 La proteína de interés puede ser cualquier proteína, por ejemplo, una enzima, una proteína farmacéuticamente activa, un factor de coagulación de la sangre, un anticuerpo, un antígeno, una vacuna, un suplemento alimenticio, un suplemento nutricional, una enzima industrial o una o más proteínas que pueden formar una "partícula similar a virus" dentro de la planta.

30 El término "partícula similar a virus" (VLP), o "partículas tipo virus" o "VLP" se refiere a estructuras que se autoensamblan y comprenden proteínas estructurales tales como la proteína HA de influenza. Generalmente las VLP son morfológica y antigénicamente similares a los viriones producidos en una infección, pero carecen de información genética suficiente para replicarse y, por lo tanto, no son infecciosas. En algunos ejemplos, las VLP pueden comprender una sola especie de proteína o más de una especie de proteína. Ver, por ejemplo, los documentos WO2009/009876; WO2009/076778; WO 2010/003225.

35 También se describen métodos para producir VLP en plantas. También se describen métodos y composiciones para la producción de VLP en plantas. Por ejemplo, se proporciona un método para producir partículas similares a virus (VLP) dentro de una planta o parte de una planta que comprende:

a) tratar la planta o parte de la planta para aumentar la producción de biomasa de hojas secundarias en la planta o parte de la planta;

45 b) introducir uno o más de un ácido nucleico en la planta o parte de la planta, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una hemaglutinina (HA), la secuencia de nucleótidos se encuentra unida operativamente a una región reguladora que es activa en la planta;

50 c) incubar la planta o parte de la planta en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la HA, para producir así la HA, en donde, el rendimiento de la HA es mayor en comparación con el rendimiento de la HA obtenida del mismo tejido vegetal de una planta similar que se cultiva en las mismas condiciones y que no se ha tratado para aumentar la biomasa secundaria.

55 El tejido vegetal puede cosecharse y las VLP pueden extraerse de la planta. Si se desea, las VLP pueden purificarse con el uso de técnicas estándar que se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, los documentos WO2009/009876; WO2009/076778; WO 2010/003225). Alternativamente, la planta puede cosecharse y usarse como alimento, nutriente o suplemento médico o la planta puede procesarse parcialmente para producir un extracto vegetal mínimamente procesado para el uso como alimento, nutriente o suplemento médico.

60 El uno o más de un ácido nucleico puede introducirse en la planta o parte de la planta cuando la relación de la biomasa de hojas secundarias respecto a la biomasa de hojas primarias está entre 0,2:1 y 3:1 o cualquier relación intermedia. Por ejemplo, la relación entre la biomasa de hojas secundarias respecto a la biomasa de hojas primarias puede ser de aproximadamente 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,2:1, 1,4:1, 1,6:1, 1,8:1, 2:1, 2,2:1, 2,4:1, 2,6:1, 2,8:1, 3:1 o cualquier relación intermedia.

65 Como se muestra en la Figura 7, una planta 10 comprende un tallo primario 20, una yema apical 40 y hojas (P1, P2, P3

y S1, S2 y S3) que salen del tallo primario 20. Las nuevas hojas que salen cerca del ápice 40 de la planta 10 se denominan P1. Las hojas P1 u hojas superiores todavía están en crecimiento y aumento de su biomasa. Las hojas P1 se localizan encima de las hojas P2 a lo largo del tallo principal e incluyen hojas muy jóvenes del 'complejo del ápice' (es decir, la yema apical y las hojas recién formadas), cuando este complejo está presente. Las hojas P1 de plantas jóvenes, por ejemplo, plantas de 25 a 30 días de edad, generalmente corresponden a la Hoja 1, la Hoja 2 y el complejo del ápice. Las hojas P2 se refieren a hojas maduras que aún no han comenzado la senescencia. Las hojas P2 incluyen hojas que casi han completado, o que han completado, su fase de expansión. Al observar una planta desde arriba, las hojas P2 son las hojas más grandes visibles y pueden enmascarar o cubrir las hojas P3. Las hojas P2 típicamente corresponden a la hoja 3, la hoja 4 y la hoja 5 en el tallo principal (la numeración de las hojas comienza en la parte superior o ápice de la planta; ver la Figura 2A de Robert y otros 2013, PLoS ONE 8(7):e70203, doi:10.1371/journal.pone.0070203). Las hojas P3, u hojas inferiores, son hojas que se localizan debajo de las hojas P2 en el tallo principal. Las hojas P3 incluyen, pero no se limitan a, hojas senescentes que pueden exhibir cierto amarillamiento. Las hojas P3 a menudo incluyen la Hoja 5, la Hoja 6, la Hoja 7 y hojas más viejas de la planta. Los síntomas de senescencia (por ejemplo, pérdida de clorofila) a menudo son visibles en la Hoja 7 o la Hoja 8. Las Hojas 5 y 6 no parecen senescentes pero a menudo contienen bajas cantidades de proteínas.

Las hojas S1, S2 y S3 están unidas a los tallos secundarios (y eventualmente terciarios). Las hojas S1 son aquellas hojas que están unidas a los tallos secundarios que salen de las hojas P1. Estas hojas secundarias están cerca del ápice y son más jóvenes que las hojas S2 y S3. Las hojas S2 están unidas a los tallos secundarios que salen de las hojas P2 y las hojas S3 están unidas a los tallos secundarios que salen de las hojas P3. Las hojas S3 son las hojas secundarias más viejas, pero como son más jóvenes son más eficientes que las hojas P3 en la producción de proteínas.

Se ha descubierto que al aumentar la biomasa de hojas secundarias en una planta aumenta el rendimiento total de una proteína de interés. Con el uso de los métodos descritos en la presente descripción, se han producido altos rendimientos de la proteína de interés cuando la producción de la proteína de interés se compara con la producción de la misma proteína de interés en una planta con el uso de un protocolo de transformación similar, y expuesta a condiciones de crecimiento similares, pero la planta o parte de la planta no se trata para aumentar la biomasa de hojas secundarias, antes de la etapa de introducción del ácido nucleico en la planta.

Como se muestra en la Figura 8, la eliminación del ápice de una planta (poda de la planta) conduce a un aumento en el rendimiento de la proteína de interés (hemaglutinina; HA) por planta en los tallos secundarios (S) y una disminución en el rendimiento de la proteína de interés (HA) por planta en los tallos primarios (P), en comparación con las plantas donde no se había eliminado el ápice. Además, la eliminación del ápice de la planta dio como resultado un aumento de 2,1 veces en la biomasa de hojas secundarias, una disminución en la biomasa de hojas primarias, con un aumento de la biomasa de hojas secundarias respecto a la biomasa de hojas primarias de 0,4:1 a 1,6:1 (ver la Tabla 3; Ejemplo 5).

Por un aumento del rendimiento de la proteína de interés, se entiende un aumento en el rendimiento de la proteína de interés de aproximadamente 5 % a aproximadamente 500 % (es decir, un aumento de hasta 5 veces), o cualquier cantidad intermedia, determinado con el uso de técnicas estándar en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 % o cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480 o 500 %, en comparación con el rendimiento de una proteína de interés expresada en una planta en donde la planta no se trató para aumentar la biomasa de hojas secundarias.

Por un aumento en la biomasa de hojas secundarias, se entiende un aumento en la biomasa de hojas secundarias de aproximadamente 2 % a aproximadamente 300 %, o cualquier cantidad intermedia (es decir, un aumento de hasta 3 veces) determinado con el uso de técnicas estándar en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 200 % o cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 30, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 45, 46, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 200, 220, 240, 260, 280 o 300 %, en comparación con una planta similar (es decir, la misma variedad de plantas) cultivada en las mismas condiciones que no se trató para aumentar la biomasa de hojas secundarias. La biomasa puede determinarse con el uso de cualquier técnica como conocerá un experto en la técnica, y puede incluir la determinación de peso fresco, peso seco, contenido de proteína, desplazamiento de volumen y similares. A menos que se indique de otra manera, "biomasa de hojas" significa la biomasa de la hoja y el pecíolo. El aumento en la biomasa de hojas secundarias puede ser el resultado de un aumento en el número de tallos y hojas secundarios, un aumento en la longitud de los tallos y hojas secundarios, un aumento en el volumen de la hoja, un aumento en el área de la hoja o una combinación de los mismos.

Después de la etapa de tratamiento de la planta, como se establece en la etapa a del método proporcionado anteriormente, la biomasa de hojas secundarias puede ser entre 20 % a 50 % de la biomasa total de la planta, o cualquier cantidad intermedia. Por ejemplo, la relación porcentual de biomasa de hojas secundarias (en relación con la biomasa utilizable de la planta) puede ser 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 % o 49 % o cualquier cantidad intermedia.

5 Como puede observarse en las Figuras 2 a 6 y 8, el nivel de acumulación de proteínas en la planta o parte de la planta está influenciado por la relación de biomasa de hojas secundarias respecto a biomasa de hojas primarias, por ejemplo, de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 1:1 (biomasa de hojas secundarias: biomasa de hojas primarias), o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo de aproximadamente 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,2:1, 1,4:1, 1,6:1, 1,8:1, 2:1, 2,2:1, 2,4:1, 2,6:1, 2,8:1, 3:1 o cualquier relación intermedia (biomasa de hojas secundarias: biomasa de hojas primarias) o cualquier cantidad intermedia.

10 La relación entre la biomasa de hojas secundarias y la biomasa de hojas primarias en una planta puede variarse mediante el aumento de la biomasa de hojas secundarias en comparación con la biomasa de hojas primarias, por ejemplo, mediante el aumento de la duración de la luz durante el crecimiento de la planta, el aumento de la intensidad de luz durante el crecimiento de la planta, la poda de la yema apical 40 (Figura 7) de la planta, el cultivo de la planta en presencia de un agente que aumenta la formación de biomasa secundaria, una hormona que aumenta la formación de biomasa secundaria, la aplicación de un compuesto químico que reduce la dominancia apical o una combinación de los mismos.

15 Se describe un método para aumentar el rendimiento de una proteína de interés mediante la modulación de la relación de biomasa de hojas secundarias respecto a biomasa de hojas primarias mediante el tratamiento de la planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias en comparación con una planta similar que no se ha tratado.

20 Por biomasa de hojas primarias (o biomasa primaria), se entiende la biomasa de una planta que abarca la biomasa de las hojas primarias (P1, P2, P3 y pecíolos asociados). Por lo tanto, la biomasa de hojas primarias no comprende la biomasa de hojas secundarias o de hojas terciarias, ni comprende la biomasa de raíces.

25 Generalmente, un tallo (también puede denominarse brote) proporciona un eje para yemas, frutos y hojas. Uno de los principales ejes estructurales de una planta vascular es el tallo principal o primario (20, Figura 7). El tallo primario 20 típicamente proporciona soporte para hojas primarias (P1, P2, P3), flores, yemas, frutos y tallos secundarios 30. La biomasa de hojas primarias comprende la biomasa de las hojas primarias (P1, P2, P3) y sus pecíolos asociados.

30 Por "formación de tallos secundarios" se entiende el inicio de nuevos tallos secundarios, el desarrollo de tallos secundarios ya iniciados, o tanto el inicio como el desarrollo de tallos secundarios iniciados, que da como resultado un aumento de la proporción de biomasa de hojas secundarias.

35 El tallo primario de una planta puede tener hojas de diferente edad que se extienden directamente desde el tallo primario 20. Las hojas del tallo primario pueden clasificarse como viejas (P3), intermedias (P2) o jóvenes (P1), en dependencia de la edad de la hoja.

40 Por biomasa de hojas secundarias (o biomasa secundaria), se entiende la biomasa de hojas y pecíolos obtenidos de tallos secundarios 30. Más específicamente, la biomasa de hojas secundarias es la biomasa que no comprende la biomasa de hojas primarias, flores, la yema apical 40 o raíces. La biomasa de hojas secundarias también puede comprender la biomasa de hojas derivada de tallos terciarios u otros que salen del tallo secundario 30.

45 Los tallos "secundarios", "auxiliares", "axilares" o "laterales" también pueden extenderse desde el tallo principal o primario 20 de una planta. Por lo tanto, un tallo secundario 30 puede comprender uno o más tallos secundarios y una o más hojas secundarias (S1, S2, S3). Además, un tallo secundario puede comprender uno o más tallos terciarios u otros. El tallo secundario 30 de una planta puede tener hojas de diferente edad y estas hojas pueden clasificarse como hojas jóvenes (S1), hojas intermedias (S2) u hojas viejas (S3).

50 Se ha descubierto que el tratamiento de la planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias antes de la infiltración del ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés aumenta el nivel de expresión de la proteína de interés (como un % de la proteína sintetizada total) y el rendimiento (mg de proteína/kg de peso fresco). El tratamiento de la planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias puede incluir, pero no se limita a, un aumento en la intensidad de luz a la que se expone la planta durante el crecimiento y que da como resultado un aumento en el crecimiento secundario, un aumento en el tiempo en que una planta se expone a la luz (duración de la luz) durante el crecimiento que da como resultado un aumento en el crecimiento secundario, las longitudes de onda a las que se expone una planta durante el crecimiento se seleccionan de modo que haya un aumento en el crecimiento secundario, la variación del régimen de temperatura durante el día/noche que da como resultado un aumento del crecimiento secundario, por ejemplo, la variación de la temperatura de aproximadamente +/-1 °C a aproximadamente +/-15 °C, o cualquier cantidad intermedia desde una base de 20 °C, la variación de la temperatura de aproximadamente +/-1 °C a aproximadamente +/-15 °C, o cualquier cantidad intermedia desde una base de 20 °C durante un período de tiempo de aproximadamente 5 min a aproximadamente 16 horas, o cualquier tiempo intermedio, si se proporciona un pulso de una temperatura diferente que sea más corto que el período de oscuridad o luz, entonces este pulso puede proporcionarse al inicio o al final del fotoperiodo, por ejemplo, se proporciona un pulso de una temperatura diferente de aproximadamente 30 min a aproximadamente 2 horas al inicio o al final del fotoperiodo, o al final del fotoperiodo.

65 Además, el tratamiento de la planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias puede incluir, pero sin limitarse a, el cultivo en presencia de un agente para inducir la formación de tallos secundarios, biomasa secundaria, o ambos, una hormona para inducir la formación de tallos secundarios, la formación de biomasa secundaria, o ambos, la aplicación de

5 un compuesto químico que reduce la dominancia apical, la poda de la yema apical primaria 40 para inducir la formación de tallos secundarios, la formación de biomasa secundaria, o ambos, la modificación genética, por ejemplo, la inserción o desactivación de genes que da como resultado un aumento de la formación de tallos secundarios, la formación de biomasa secundaria, o ambas, el fitomejoramiento en combinación con la selección de plantas que exhiben un aumento en el crecimiento secundario en comparación con sus cepas progenitoras, o una combinación de los mismos.

10 Por "luz" se entiende la luz que comprende el espectro de longitudes de onda que utilizan las hojas de una planta, por ejemplo, longitudes de onda de aproximadamente 400 a aproximadamente 700 nm o cualquier longitud de onda intermedia, y puede incluir el azul, el verde y el rojo y, si es necesario, partes de longitud de onda infrarroja del espectro electromagnético. Cualquier fuente de luz adecuada que emita longitudes de onda que la planta pueda utilizar incluye, por ejemplo, luz natural, una fuente de haluro metálico cerámico, una fuente de haluro metálico, una fuente de sodio a alta presión, LED, una fuente fluorescente, una fuente incandescente o un combinación de las mismas.

15 La etapa de tratamiento de la planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias antes de la infiltración puede llevarse a cabo durante todo el ciclo de crecimiento de la planta desde la germinación (es decir, el día 0) hasta la infiltración (es decir, la introducción del vector recombinante en la planta) o el día de la cosecha de la planta, o cualquier tiempo intermedio. Por ejemplo, si el tratamiento es un fotoperiodo de 24 h, entonces la plántula germinada puede exponerse a este fotoperiodo durante un período de tratamiento que se extiende desde el día de la germinación, hasta la etapa de transformación o infiltración de la planta, la incubación de la planta transformada y hasta el día de la cosecha. Sin embargo, también pueden usarse períodos más cortos de tratamiento.

25 De manera similar, la etapa de tratamiento de una planta para aumentar el crecimiento secundario puede incluir un aumento en la intensidad de luz a la que una planta se expone a la luz durante el crecimiento y que da como resultado un aumento en el crecimiento secundario. Este tratamiento puede aplicarse durante todo el tiempo de crecimiento de la planta desde la germinación, hasta la transformación o infiltración de la planta, hasta el día de la cosecha de la planta, o en cualquier tiempo intermedio. De manera similar, la exposición de las plantas a longitudes de onda seleccionadas durante el crecimiento de modo que dé como resultado un aumento en el crecimiento secundario, puede aplicarse durante todo el tiempo de crecimiento de la planta desde la germinación (es decir, el día 0) hasta la infiltración (es decir, la introducción del vector recombinante en la planta), o el día de la cosecha de la planta, o cualquier tiempo intermedio. El régimen de temperatura durante el día/noche puede variarse (de aproximadamente +/-1 °C a aproximadamente +/-15 °C, o cualquier cantidad intermedia desde una base de 20 °C; o pueden proporcionarse pulsos de temperatura transportada) para aumentar el crecimiento secundario de la planta, y la planta puede exponerse a este tratamiento durante todo el ciclo de crecimiento de la planta desde la germinación (es decir, el día 0) hasta la infiltración (es decir, la introducción del vector recombinante en la planta), o el día de la cosecha de la planta, o cualquier tiempo intermedio.

35 Alternativamente, pueden aplicarse otros métodos de tratamiento para aumentar la biomasa de hojas secundarias de la planta antes de la etapa de transformación o infiltración, puede ser de aproximadamente 20 días antes de la infiltración hasta el día de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo 20 días antes de la infiltración, hasta el día de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo de 20 días, 19 días, 18, días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día antes de la infiltración, hasta el día de la infiltración o cualquier tiempo intermedio.

45 El uso de aumentar la duración de la luz, para aumentar la biomasa de hojas secundarias, implica exponer la planta de aproximadamente 12 h a aproximadamente 24 h de luz o cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 h. Por ejemplo, la duración de la luz puede ser de 24 h, de modo que la planta se expone a luz constante antes de la etapa de infiltración.

50 El aumento en la duración de la luz puede llevarse a cabo desde aproximadamente el día de la germinación hasta el día de la infiltración, o el día de la cosecha de la planta, o cualquier tiempo intermedio. Por ejemplo, que no debe considerarse limitante, de 40 días, 35 días, 30 días, 25 días, 20 días, 19 días, 18, días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días antes de la infiltración, el día de la infiltración, el día de la cosecha o cualquier tiempo intermedio. Un experto puede determinar fácilmente el intervalo apropiado antes de la poda.

55 La intensidad de luz puede incluir luz solar natural o luz solar natural suplementada con luz artificial o luz artificial. Si la luz artificial se usa sola, o se usa para suplementar la luz solar natural, entonces puede usarse de aproximadamente 60 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) a aproximadamente 200 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) o cualquier valor intermedio, por ejemplo, aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) o cualquier cantidad intermedia. Por ejemplo, la intensidad de luz puede ser 160 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$). El aumento en la intensidad de luz puede llevarse a cabo durante todo el ciclo de crecimiento de la planta desde la germinación (es decir, el día 0) hasta la infiltración (es decir, la introducción del vector recombinante en la planta), o el día de la cosecha de la planta, o cualquier tiempo intermedio. Por ejemplo, de aproximadamente, por ejemplo, de aproximadamente 40 días, 35 días, 30 días, 25 días, 20 días, 19 días, 18, días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días 3 días, 2 días, 1 día antes de la infiltración, el día de la infiltración, el día de la cosecha de la planta o cualquier tiempo intermedio. Un experto puede determinar fácilmente el intervalo apropiado antes de la poda.

- 5 Por poda se entiende la eliminación de una o más de una yema apical 40, o la eliminación de la punta o parte superior del tallo que incluye la yema apical 40. La poda también puede incluir destruir, inducir necrosis o reducir el crecimiento de las yemas apicales sin eliminar las yemas de la planta. Por reducción del crecimiento de la yema (o reducir el crecimiento de la yema), se entiende que la yema exhibe una reducción, por ejemplo, en la actividad metabólica, o un aumento de tamaño durante un período de tiempo definido, de aproximadamente 50 % a 100 %, o cualquier cantidad intermedia, en comparación con una yema que no se ha tratado. La poda también puede realizarse mediante la aplicación de un compuesto químico que reduce la dominancia apical. Si se aplica un compuesto químico con fines de poda, las dosis usadas son típicamente las recomendadas por el fabricante del compuesto químico.
- 10 La poda puede realizarse por cualquier medio conocido por un experto en la técnica e incluye, pero no se limita a, la eliminación mecánica de la yema, por ejemplo, pero sin limitarse a, corte, recorte, despunte, compresión, por ejemplo, con el uso de pinzas y similares, congelación localizada, por ejemplo, al dirigir una corriente localizada de nitrógeno líquido a la yema, o rodear la yema con pinzas u otro dispositivo que se ha enfriado con el uso de una fuente de frío apropiada que incluye nitrógeno líquido, hielo seco, hielo seco con etanol, hielo y similares, de modo que la temperatura de la yema se reduzca para reducir el crecimiento de la yema o destruir la yema.
- 15 La poda también incluye la poda química, por ejemplo, la aplicación de un herbicida (compuesto químico; agente de poda) que destruye o reduce el crecimiento de la yema, o la aplicación de un regulador del crecimiento que destruye o reduce el crecimiento de la yema. El uso de la poda química permite una manera eficiente de tratamiento de poda ya que las plantas pueden tratarse fácilmente mediante pulverización, nebulización, remojo, del compuesto químico en la planta o inmersión de las plantas en una solución que comprende el compuesto químico. Las plantas pueden tratarse una vez antes de la etapa de infiltración, o tratarse más de una vez antes de la etapa de infiltración. El agente, compuesto químico u hormona aumenta la formación de tallos secundarios, la formación de biomasa secundaria, o ambos, o reduce la dominancia apical o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la planta puede cultivarse o tratarse con citocinas o fitohormonas que promueven la formación de tallos secundarios o reducen la dominancia apical o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la planta puede tratarse con una fitohormona tal como, por ejemplo, con una citoquinina (CK) para aumentar o promover la formación de tallos secundarios. La citoquinina puede ser, por ejemplo, una citoquinina sintética tal como la 6-bencilaminopurina (BAP) también conocida como benciladenina.
- 20 Una planta puede tratarse con una cantidad de fitohormona de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 900 ppm o cualquier cantidad intermedia, por ejemplo, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm, 400 ppm, 450 ppm, 500 ppm, 550 ppm, 600 ppm, 650 ppm, 700 ppm, 750 ppm, 800 ppm, 850 ppm, 900 ppm o cualquier cantidad intermedia. Por ejemplo, la planta puede tratarse con aproximadamente 100 ppm a 500 ppm de una fitohormona, por ejemplo, BAP.
- 25 Como se muestra en las Figuras 9, 10 y 11, el tratamiento de las plantas con BAP tuvo poco efecto sobre la biomasa primaria pero tuvo un efecto positivo significativo sobre la producción de biomasa secundaria (ver la Figura 9b).
- 30 Además, un agente o compuesto químico que reduce la dominancia apical puede aplicarse a la planta, por ejemplo, la planta puede podarse químicamente o tratarse de otra manera para reducir la dominancia apical. Los ejemplos de compuestos químicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, herbicidas, por ejemplo, reguladores del crecimiento de las plantas Ethephon (por ejemplo, Bromeflor, Cerone, Chlorethephon Ethrel, Florel, Prep y Flordimex), Daminozida (ácido butanodioico mono-2,2-dimetilhidrazina, ácido 2,2-dimetilhidrazida succínico; por ejemplo, B-nine; Alar, Kylar, SADH, B-nine, B-995, aminozida), Atrimmec (dikegulac sodio), hidrazida maleica (1,2,-dihidro-3,6-piridazinodiona), e incluye inhibidores de la síntesis de ácido giberélico, por ejemplo, pero sin limitarse a, Cycocel (cloruro de cloromequat), A-Rest (ancimidol), triazoles, por ejemplo, Bonzi (paclobutrazol), Sumagic (uniconazol) o 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT). Estos compuestos pueden usarse a intervalos de dosis conocidos para la modificación del crecimiento de las plantas, por ejemplo, el intervalo de dosis usado puede ser el recomendado por el fabricante del compuesto químico. Estos compuestos también pueden usarse a intervalos de dosis que están por debajo de los conocidos para la modificación del crecimiento de las plantas, por ejemplo, el intervalo de dosis usado puede usarse a 75 %, 50 %, 25 %, 10 % del recomendado por el fabricante del compuesto químico. Estos compuestos pueden usarse de aproximadamente 0,2 ppm a aproximadamente 5000 ppm, y cualquier cantidad intermedia, en dependencia del regulador del crecimiento seleccionado. Además, el agente de poda (compuesto químico) puede aplicarse una vez, o pueden realizarse aplicaciones adicionales según sea necesario. Por ejemplo, el compuesto químico puede aplicarse una vez, o el compuesto químico puede aplicarse más de una vez, para dar como resultado una poda química de la planta antes o después de la infiltración. Si se usa la poda química, el compuesto químico puede aplicarse desde aproximadamente 20 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días después de la infiltración o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, la aplicación de un compuesto químico a 14 días, 7 días o 5 días antes a la infiltración puede usarse eficazmente.
- 35 La poda de la yema apical puede llevarse a cabo desde aproximadamente 20 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo 19 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, 18 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, 17 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, 16 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo 15 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo

intermedio, por ejemplo 14 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo 13 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, 12 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, desde aproximadamente 11 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, desde aproximadamente 10 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, desde aproximadamente 9 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, desde aproximadamente 8 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, desde aproximadamente 7 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, desde aproximadamente 6 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, de aproximadamente 5 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, para ejemplo, desde aproximadamente 4 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio, por ejemplo, de aproximadamente 3 días antes de la infiltración hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio o desde 20 días, 19 días, 18 días, 17 días, 16 días, 15 días, 14 días, 13 días, 12 días, 11 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días 3 días antes de la infiltración, hasta aproximadamente 2 días antes de la infiltración, o cualquier tiempo intermedio. Un experto puede determinar fácilmente el intervalo apropiado antes de la poda.

El método puede incluir además la cosecha de la planta o una parte de la planta. Por ejemplo, puede cosecharse la planta completa que comprende tallos primarios y secundarios. Alternativamente, puede cosecharse una parte de la planta que comprende biomasa secundaria, biomasa primaria o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden cosecharse las hojas S1, S2, S3, P1, P2, P3, las hojas S1, S2, S3, P1, P2, P3 con pecíolos asociados o cualquier combinación de las mismas. Las hojas viejas (P3) de la planta pueden excluirse de la cosecha si se desea.

Por el término "parte de una planta" se entiende cualquier parte derivada de una planta, que incluye el tejido obtenido de la planta, por ejemplo, pero sin limitarse a las hojas, las hojas y el tallo, las raíces, la parte aérea que incluye las hojas, tallo y opcionalmente la parte floral de la planta, células, protoplastos o cualquier combinación de los mismos obtenida de la planta. Por ejemplo, "parte de una planta" puede referirse a las hojas o tallos de una planta. Una parte de la planta también puede comprender biomasa secundaria, biomasa primaria o una combinación de las mismas, por ejemplo, hojas S1, S2, S3, P1, P2, P3, hojas S1, S2, S3, P1, P2, P3 con pecíolos asociados o cualquier combinación de las mismas.

Por el término "materia vegetal" se entiende cualquier material derivado de una planta. La materia vegetal puede comprender una planta completa, tejido, células o cualquier fracción de los mismos. Además, la materia vegetal puede comprender componentes vegetales intracelulares, componentes vegetales extracelulares, extractos líquidos o sólidos de plantas, o una combinación de los mismos. Además, la materia vegetal puede comprender plantas, células vegetales, tejidos, un extracto líquido, o una combinación de los mismos, de hojas, tallos, frutos, raíces de las plantas o una combinación de los mismos. La materia vegetal puede comprender una planta o parte de la misma que no se ha sometido a ninguna etapa de procesamiento. Sin embargo, también se contempla que el material vegetal pueda someterse a etapas de procesamiento mínimo como se define a continuación, o a un procesamiento más riguroso, que incluye la purificación de proteínas parcial o sustancial con el uso de técnicas comúnmente conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a cromatografía, electroforesis y similares.

La proteína de interés producida puede purificarse, purificarse parcialmente a partir de una planta, parte de una planta o materia vegetal, o puede administrarse como una vacuna oral, con el uso de métodos conocidos para un experto en la técnica. La purificación puede incluir la producción de una fracción de apoplastos como se describe en el documento WO 2011/035422. Para la cromatografía preparativa de exclusión por tamaño, puede obtenerse una preparación que comprende la proteína de interés y el material insoluble puede eliminarse por centrifugación. También puede usarse la precipitación con PEG. La proteína recuperada puede cuantificarse con el uso de métodos convencionales (por ejemplo, ensayo de Bradford, BCA), y el extracto se hace pasar a través de una columna de exclusión por tamaño, con el uso de, por ejemplo, SEPHACRYLTM, SEPHAEXTM o un medio similar, y se recolectan las fracciones. Blue Dextran 2000 o una proteína adecuada, puede usarse como estándar de calibración. El extracto también puede hacerse pasar a través de una columna de intercambio catiónico y las fracciones activas se recolectan. Después de la cromatografía, las fracciones pueden analizarse adicionalmente mediante electroforesis de proteínas, inmunotransferencia, o ambas, para confirmar la presencia de la proteína de interés y el complemento proteico de la fracción.

Por el término "procesamiento mínimo" se entiende materia vegetal, por ejemplo, una planta o parte de la misma que comprende una proteína de interés que se purifica parcialmente para producir un extracto vegetal, homogeneizado, fracción de homogeneizado vegetal o similar (es decir, mínimamente procesado). La purificación parcial puede comprender, pero no se limita a romper las estructuras celulares de la planta para crear así una composición que comprende componentes vegetales solubles y componentes vegetales insolubles que pueden separarse mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración o una combinación de los mismos. En este sentido, las proteínas secretadas dentro del espacio extracelular de la hoja u otros tejidos podrían obtenerse fácilmente con el uso de vacío o extracción centrífuga, o los tejidos podrían extraerse bajo presión mediante el paso a través de rodillos o trituración o similares para exprimir o liberar la proteína libre dentro del espacio extracelular. El procesamiento mínimo también podría implicar la preparación de extractos crudos de proteínas solubles, ya que estas preparaciones tendrían una contaminación

insignificante de productos vegetales secundarios. Además, el procesamiento mínimo puede implicar la extracción acuosa de proteína soluble de las hojas, seguida de la precipitación con cualquier sal adecuada. Otros métodos pueden incluir la maceración a gran escala y la extracción de jugo para permitir el uso directo del extracto.

5 Por "secuencia de nucleótidos (o ácido nucleico) de interés", o "región codificante de interés", se entiende cualquier secuencia de nucleótidos, o región codificante (estos términos pueden usarse indistintamente) que se expresará dentro de un organismo huésped, por ejemplo una planta, para producir una proteína de interés. Dicha secuencia de nucleótidos de interés puede codificar, pero no se limita a, proteínas nativas o modificadas, una enzima industrial o una enzima industrial modificada, una proteína agrícola o una proteína agrícola modificada, una proteína auxiliar, un suplemento proteico, una proteína farmacéuticamente activa, un nutracéutico, un producto de valor agregado o un fragmento del mismo para piensos, alimentos o tanto para piensos como para uso alimentario.

15 La proteína de interés puede expresarse en cualquier huésped vegetal adecuado que se transforma con la secuencia de nucleótidos, o construcciones, o vectores descritos en la presente descripción. Los ejemplos de huéspedes adecuados incluyen, pero no se limitan a, *Arabidopsis*, cultivos agrícolas que incluyen, por ejemplo, canola, *Brassica* spp., maíz, *Nicotiana* spp., (tabaco), por ejemplo, *Nicotiana benthamiana*, alfalfa, patata, batata (*Ipomoea batatas*), ginseng, guisante, avena, arroz, soja, trigo, cebada, girasol, algodón, maíz, centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), cártamo (*Carthamus tinctorius*).

20 "Casete de expresión" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende un ácido nucleico de interés bajo el control de, y operablemente (u operativamente) unido a, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción del ácido nucleico de interés en una célula huésped, por ejemplo una célula vegetal.

25 Por "región reguladora", "elemento regulador" o "promotor" se entiende una parte de ácido nucleico típicamente, pero no siempre, corriente arriba de la región codificante de proteínas de un gen, que puede estar compuesto por ADN o ARN, o tanto ADN como ARN.

30 Por "unido operativamente" se entiende que las secuencias particulares interactúan directa o indirectamente para llevar a cabo una función prevista, tal como la mediación o la modulación de la expresión génica. La interacción de secuencias unidas operativamente puede, por ejemplo, estar mediada por proteínas que interactúan con las secuencias unidas operativamente. Una región reguladora de la transcripción y una secuencia de interés están unidas operablemente cuando las secuencias se conectan funcionalmente para permitir que la transcripción de la secuencia de interés sea mediada o modulada por la región reguladora de la transcripción.

35 Cuando una región reguladora está activa, y en asociación operativa, o unida operativamente, con un gen de interés, esta puede dar como resultado la expresión del gen de interés. Un elemento regulador puede ser capaz de mediar la especificidad en un órgano o controlar la activación de genes por el desarrollo o temporal. Una "región reguladora" incluye elementos promotores, elementos promotores mínimos que exhiben una actividad promotora basal, elementos que son inducibles en respuesta a un estímulo externo, elementos que median la actividad promotora tales como elementos reguladores negativos o potenciadores de la transcripción. "Región reguladora", como se usa en la presente descripción, también incluye elementos que son activos después de la transcripción, por ejemplo, elementos reguladores que modulan la expresión génica tales como potenciadores de la transcripción y la traducción, represores de la transcripción y la traducción, secuencias activadoras corriente arriba y determinantes de inestabilidad del ARNm. Varios de estos últimos elementos pueden ubicarse próximos a la región codificante.

45 En el contexto de esta descripción, el término "elemento regulador" o "región reguladora" típicamente se refiere a una secuencia de ADN, generalmente, pero no siempre, corriente arriba (5') a la secuencia codificante de un gen estructural, que controla la expresión de la región codificante al proporcionar el reconocimiento para la ARN polimerasa y/u otros factores necesarios para que la transcripción comience en un sitio particular. Sin embargo, debe entenderse que otras secuencias de nucleótidos, ubicadas dentro de los intrones, o 3' de la secuencia también pueden contribuir a la regulación de la expresión de una región codificante de interés. Un ejemplo de un elemento regulador que proporciona el reconocimiento de la ARN polimerasa u otros factores de transcripción para garantizar el inicio en un sitio particular es un elemento promotor.

55 La mayoría, pero no todos, los elementos promotores eucariotas contienen una caja TATA, una secuencia de ácido nucleico conservada compuesta por pares de bases de nucleótidos de adenosina y timidina, generalmente situados aproximadamente a 25 pares de bases corriente arriba de un sitio de inicio de la transcripción. Un elemento promotor comprende un elemento promotor basal, responsable del inicio de la transcripción, así como otros elementos reguladores (como se enumeró anteriormente) que modifican la expresión génica.

60 Una región reguladora constitutiva dirige la expresión de un gen a través de las diversas partes de una planta y de manera continua a lo largo del desarrollo de la planta.

65 Los ejemplos de elementos reguladores constitutivos conocidos incluyen promotores asociados con el transcrito 35S de CaMV. (Odell y otros, 1985, Nature, 313: 810-812), los genes de actina de arroz 1 (Zhang y otros, 1991, Plant Cell, 3: 1155-1165), actina 2 (An y otros, 1996, Plant J., 10: 107-121), o tms 2 (U.S. 5,428,147) y trifosfato isomerasa 1 (Xu y

otros, 1994, *Plant Physiol.* 106: 459-467), el gen de ubiquitina 1 de maíz (Cornejo y otros, 1993, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), los genes de ubiquitina 1 y 6 de *Arabidopsis* (Holtorf y otros, 1995, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646), y el gen del factor de inicio de la traducción 4A del tabaco (Mandel y otros, 1995 *Plant Mol. Biol.* 29: 995-1004). El término "constitutivo", como se usa en la presente descripción, no indica necesariamente que un gen bajo el control de la región reguladora constitutiva se expresa al mismo nivel en todos los tipos de células, sino que el gen se expresa en una amplia variedad de tipos de células aun cuando a menudo se observa variación en la abundancia.

En otro ejemplo la proteína de interés puede expresarse en un sistema de expresión que comprende regiones o elementos de amplificación y/o elementos reguladores (también denominados elementos potenciadores en la presente descripción). Por ejemplo, un elemento de amplificación de un geminivirus tal como, por ejemplo, un elemento de amplificación del virus del mosaico enano amarillo del frijol (BeYDV) puede usarse para expresar la proteína de interés. BeYDV pertenece al género *Mastrevirus* adaptado a plantas dicotiledóneas. BeYDV es monopartita con un genoma de ADN circular monocatenario y puede replicarse a números de copia muy altos mediante un mecanismo de círculo rodante. Los sistemas de vectores replicones de ADN derivados de BeYDV se han usado para la producción rápida de proteínas con alto rendimiento en plantas.

Como se usa en la presente descripción, la frase "elementos de amplificación" se refiere a un segmento de ácido nucleico que comprende al menos una parte de una o más regiones intergénicas largas (LIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en la presente descripción, "región intergénica larga" se refiere a una región de una región intergénica larga que contiene un sitio de unión a rep capaz de mediar la escisión y replicación por una proteína Rep de geminivirus. En algunos aspectos, el segmento de ácido nucleico que comprende una o más LIR, puede comprender además una región intergénica corta (SIR) de un genoma de geminivirus. Como se usa en la presente descripción, "región intergénica corta" se refiere a la cadena complementaria (la IR corta (SIR) de un *Mastrevirus*). En la presente descripción puede usarse cualquier elemento de amplificación derivado de geminivirus adecuado. Ver, por ejemplo, los documentos WO2000/20557; WO2010/025285; Zhang X. y otros (2005, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93, 271-279), Huang Z. y otros (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 103, 706-714), Huang Z. y otros (2009, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 106, 9-17)). Si se usa más de una LIR en la construcción, por ejemplo, dos LIR, entonces el promotor, las regiones CMPV-HT y la secuencia de ácido nucleico de interés y el terminador están flanqueados por cada una de las dos LIR.

Se pueden usar elementos potenciadores para lograr un alto nivel de expresión transitoria de la proteína de interés. Los elementos potenciadores pueden basarse en virus de plantas de ARN, que incluyen los comovirus, tales como el *virus del mosaico del caupí* (CPMV; ver, por ejemplo, los documentos WO2007/135480; WO2009/087391; US 2010/0287670, Sainsbury F. y otros, 2008, *Plant Physiology*; 148: 121-1218; Sainsbury F. y otros, 2008, *Plant Biotechnology Journal*; 6: 82-92; Sainsbury F. y otros, 2009, *Plant Biotechnology Journal*; 7: 682-693; Sainsbury F. y otros 2009, *Methods in Molecular Biology, Recombinant Proteins From Plants*, vol. 483: 25-39), "CPMV HT+" como se describe en el documento US 61/971,274 o "CPMVX" (también denominado "CPMV 160") y/o "CPMVX+" (también denominado "CPMV 160+") como se describe en el documento US 61/925,852.

El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) puede estar implicado en la limitación de la expresión de transgenes en plantas, y la coexpresión de un supresor del silenciamiento del virus Y de la patata (HcPro) puede usarse para contrarrestar la degradación específica de los ARNm transgénicos (Brigneti y otros, 1998, *EMBO J.* 17, 6739-6746). Los supresores de silenciamiento alternativos se conocen bien en la técnica y pueden usarse como se describe en la presente descripción (Chiba y otros, 2006, *Virology* 346:7-14), por ejemplo, pero sin limitarse a, TEV-p1/HC-Pro (virus del grabado del tabaco-p1/HCPro), BYV -p21, p19 del virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV p19; la construcción de p19 se describe en el documento WO 2010/0003225), proteína de la cápside del virus del arrugamiento del tomate (TCV -CP), 2b del virus del mosaico del pepino; CMV-2b), p25 del virus X de la patata (PVX-p25), p11 del virus M de la patata (PVM-p11), p11 del virus S de la patata (PVS-p11), p16 del virus de la quemazón del arándano (BScV -p16), p23 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV-p23), p24 del virus-2 asociado al enrollamiento de la hoja de vid, (GLRaV-2 p24), p10 del virus de la vid A, (GVA-p10), p14 del virus de la vid B (GVB-p14), p10 del virus latente de *Heracleum* (HLV-p10) o p16 del virus latente común del ajo (GCLV-p16).

Por lo tanto, uno o más supresores de silenciamiento, por ejemplo, pero sin limitarse a, HcPro, TEV -p1/HC-Pro, BYV-p21, TBSV p19, TCV-CP, CMV-2b, PVX-p25, rgscam, proteína B2 de FHV, la proteína de envoltura pequeña de CPMV y la proteína de envoltura de TCV, PVM-p11, PVS-p11, BScV-p16, CTV-p23, GLRaV-2 p24, GBV-p14, HLV-p10, GCLV-p16 o GVA-p10 pueden coexpresarse junto con el casete de expresión basado en comovirus, el elemento de amplificación derivado de geminivirus y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés para garantizar aún más altos niveles de producción de proteínas dentro de una planta.

Las construcciones descritas en la presente descripción pueden introducirse en células vegetales con el uso de plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus de plantas, transformación directa de ADN, microinyección, electroporación, etcétera. Para reseñas de tales técnicas ver, por ejemplo, Weissbach y Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, Nueva York VIII, pp. 421-463 (1988); Geierman y Corey, *Plant Molecular Biology*, 2da Ed. (1988); y Miki e Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*. En *Plant Metabolism*, 2da Ed. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell (eds), Addison Wesley, Langmans Ltd. Londres, pp. 561-579 (1997). Otros métodos incluyen la captación directa de ADN, el uso de liposomas, la electroporación, por ejemplo con el uso de protoplastos, microinyección, microproyectiles o fibras

e infiltración al vacío. Ver, por ejemplo, Bilang, y otros (1991, Gene 100: 247-250), Scheid y otros (1991, Mol. Gen. Genet. 228: 104-112), Guerche y otros (1987, Plant Science 52: 111-116), Neuhauser y otros (1987, Theor. Appl Genet. 75: 30-36), Klein y otros, (1987, Nature 327: 70-73); Freeman y otros (1984, Plant Cell Physiol. 29: 1353), Howell y otros (1980, Science 208: 1265), Horsch y otros (1985, Science 227: 1229-1231), DeBlock y otros, (1989, Plant Physiology 91: 694-701), Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach y Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), Methods in Plant Molecular Biology (Schuler y Zielinski, eds., Academic Press Inc., 1989), documentos WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Liu y Lomonosoff (2002, J Virol Meth, 105:343-348), documentos EP 290395; WO 8706614; patentes de Estados Unidos núm. 4,945,050; 5,036,006; y 5,100,792, solicitudes de patente de Estados Unidos con núm. de serie 08/438,666, presentada el 10 de mayo de 1995 y 07/951,715, presentada el 25 de septiembre de 1992).

Los métodos de expresión transitoria pueden usarse para expresar las construcciones descritas en la presente descripción (ver D'Aoust y otros, 2009, Methods in molecular biology, Vol 483, páginas 41-50; Liu y Lomonosoff, 2002, Journal of Virological Methods, 105:343-348). Alternativamente, puede usarse un método de expresión transitoria basado en vacío, como se describe en Kapila y otros, (1997, Plant Sci. 122, 101-108) o los documentos WO 00/063400, WO 00/037663. Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, un método de agroinoculación o agroinfiltración, infiltración con jeringa, sin embargo, también pueden usarse otros métodos transitorios como se indicó anteriormente. Con agroinoculación, agroinfiltración o infiltración con jeringa, una mezcla de *Agrobacterias* que comprende el ácido nucleico deseado se introduce en los espacios intercelulares de un tejido, por ejemplo, las hojas, la parte aérea de la planta (que incluye el tallo, las hojas y la flor), otra parte de la planta (tallo, raíz, flor) o la planta completa. Después de cruzar la epidermis, las *Agrobacterias* infectan y transfieren copias de ADN-t a las células. El ADN-t se transcribe de manera episomal y el ARNm se traduce, lo que conduce a la producción de la proteína de interés en las células infectadas, sin embargo, el paso del ADN-t dentro del núcleo es transitorio.

En la presente descripción también se describen plantas, células vegetales o semillas transgénicas que contienen la construcción génica descrita en la presente descripción que pueden usarse como una planta de plataforma adecuada para la expresión transitoria de proteínas descrita en la presente descripción. Los métodos para regenerar plantas completas a partir de células vegetales también se conocen en la técnica (por ejemplo, ver Guerineau y Mullineaux (1993, Plant transformation and expression vectors). En: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed. Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148). En general, las células vegetales transformadas se cultivan en un medio apropiado, que puede contener agentes de selección tales como antibióticos, donde se usan marcadores de selección para facilitar la identificación de las células vegetales transformadas. Una vez que se forma el callo, se puede fomentar la formación de brotes con el empleo de las hormonas vegetales apropiadas de acuerdo con métodos conocidos y los brotes se transfieren a un medio de enraizamiento para la regeneración de las plantas. Las plantas pueden usarse después para establecer generaciones repetitivas, ya sea a partir de semillas o con el uso de técnicas de propagación vegetativa. Las plantas transgénicas también pueden generarse sin usar cultivo de tejidos. Los métodos para la transformación estable y la regeneración de estos organismos están establecidos en la técnica y son conocidos para un experto en la técnica. Las técnicas disponibles se reseñan en Vasil y otros, (Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. I, II y III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984), y Weissbach y Weissbach (Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989). El método para obtener plantas transformadas y regeneradas no es crítico.

Si las plantas, la parte de la planta o la célula vegetal van a transformarse o cotransformarse con dos o más construcciones de ácido nucleico, la construcción de ácido nucleico puede introducirse en el *Agrobacterium* en un solo evento de transfección, los ácidos nucleicos se combinan y las células bacterianas se transfectan como se describió. Alternativamente, las construcciones pueden introducirse en serie. En este caso, se introduce una primera construcción en el *Agrobacterium* como se describió, las células se cultivan en condiciones de selección (por ejemplo, en presencia de un antibiótico) donde solo pueden crecer las bacterias transformadas individualmente. Después de esta primera etapa de selección, se introduce una segunda construcción de ácido nucleico en el *Agrobacterium* como se describió, y las células se cultivan en condiciones de doble selección, donde solo pueden crecer las bacterias doblemente transformadas. Las bacterias doblemente transformadas pueden usarse después para transformar una planta, parte de la planta o célula vegetal como se describe en la presente descripción, o pueden someterse a una etapa de transformación adicional para acomodar una tercera construcción de ácido nucleico.

Alternativamente, si las plantas, una parte de la planta o una célula vegetal van a transformarse o cotransformarse con dos o más construcciones de ácido nucleico, la construcción de ácido nucleico puede introducirse en la planta mediante la coinfiltración de una mezcla de células de *Agrobacterium* con la planta, parte de la planta o célula vegetal, cada célula de *Agrobacterium* puede comprender una o más construcciones a introducir dentro de la planta. Para variar los niveles de expresión relativa dentro de la planta, parte de la planta o célula vegetal, de una secuencia de nucleótidos de interés dentro de una construcción, durante la etapa de infiltración, puede variarse la concentración de las diversas poblaciones de *Agrobacterias* que comprenden las construcciones deseadas.

La proteína de interés puede comprender un péptido señal nativo o no nativo; el péptido señal no nativo puede ser de origen vegetal. Por ejemplo, el péptido señal puede ser un péptido señal de proteína disulfuro isomerasa (PDI). El péptido señal nativo puede corresponder al de la proteína de interés que se expresa. La secuencia de nucleótidos de interés, o la región codificante de interés también puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína farmacéuticamente activa, por ejemplo factores de crecimiento, reguladores del crecimiento, anticuerpos, antígenos y fragmentos de los mismos, o sus derivados útiles para la inmunización o vacunación y similares. Dichas proteínas

incluyen, pero no se limitan a, una proteína que es un patógeno humano, una proteína viral, por ejemplo, pero sin limitarse a una o más proteínas del virus sincitial respiratorio

(RSV), rotavirus, virus de la influenza, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la rabia, virus del papiloma humano (VPH), enterovirus 71 (EV71) o interleucinas, por ejemplo, una o más de una de IL-1 a IL-24, IL-26 e IL-27, citocinas, eritropoyetina (EPO), insulina, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF o combinaciones de los mismos, interferones, por ejemplo, interferón alfa, interferón beta, interferón-gamma, factores de coagulación de la sangre, por ejemplo, Factor VIII, Factor IX o tPA hGH, receptores, agonistas de receptores, anticuerpos, por ejemplo, pero sin limitarse a, Rituxan, neuropolipéptidos, insulina, vacunas, factores de crecimiento, por ejemplo, pero sin limitarse a, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento de transformación, reguladores del crecimiento, antígenos, autoantígenos, fragmentos de los mismos o combinaciones de los mismos.

La proteína de interés también puede incluir una hemaglutinina de influenza (HA; ver el documento WO 2009/009876). La HA es una glicoproteína de membrana de tipo I homotrímica, que generalmente comprende un péptido señal, un dominio HA1 y un dominio HA2 que comprende un sitio de anclaje que abarca la membrana en el extremo C-terminal y una cola citoplasmática pequeña. Las secuencias de nucleótidos que codifican HA se conocen bien y están disponibles (ver, por ejemplo, la Base de Datos BioDefense and Public Health (Influenza Research Database; Squires y otros, 2008 Nucleic Acids Research 36:D497-D503) en URL: biohealth-base.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza; o las bases de datos mantenidas por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (ver URL: ncbi.nlm.nih.gov).

Una proteína HA puede ser de una influenza tipo A, una influenza tipo B o es un subtipo de influenza HA tipo A seleccionada del grupo de H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 y H16. La HA puede ser de una influenza tipo A, seleccionada del grupo H1, H2, H3, H5, H6, H7 y H9. Los fragmentos de las HA enumeradas anteriormente también pueden considerarse una proteína de interés. Además, los dominios de un tipo o subtipo de las HA enumeradas anteriormente pueden combinarse para producir HA quiméricas (ver, por ejemplo, el documento WO2009/076778).

Los ejemplos de subtipos que comprenden proteínas HA incluyen A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Indonesia/5/2006 (H5N1), A/pollo/Nueva York/1995, A/gaviota argétea/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/ánade/MN/33/00, A/pato/Shanghai/1/2000, A/ánade rabudo/TX/828189/02, A/Pavo/Ontario/6118/68 (H8N4), A/pato cuchareta/Irán/G54/03, A/pollo/Alemania/N/1949 (H10N7), A/pato/Inglaterra/56 (H11N6), A/pato/Alberta/60/76 (H12N5), A/Gaviota/Maryland/704/77 (H13N6), A/Ánade/Gurjev/263/82, A/pato/Australia/341/83 (H15N8), A/gaviota de cabeza negra/Suecia/5/99 (H16N3), B/Lee/40, C/Johannesburgo/66, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Islands Salomón 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malasia/2506/2004, B/Florida/4/2006, A/Singapur/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), A/Cerceta/Hong-Kong/W312/97 (H6N1), A/Equino/Praga/56 (H7N7), A/Hong Kong/1073/99 (H9N2)).

La proteína HA puede ser un subtipo H1, H2, H3, H5, H6, H7 o H9. Por ejemplo, la proteína H1 puede ser de la cepa A/Nueva Caledonia/20/99 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Islands Salomón 3/Cepa 2006 (H1N1), A/California/04/2009 (H1N1) o A/California/07/2009 (H1N1). La proteína H3 también puede ser de la cepa A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Victoria/361/2011 (H3N2), A/Texas/50/2012 (H3N2), A/Hawaii/22/2012 (H3N2), A/Nueva York/39/2012 (H3N2) o A/Perth/16/2009 (H3N2). La proteína H2 puede ser de la cepa A/Singapur/1/57 (H2N2). La proteína H5 puede ser de la cepa A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) o A/Indonesia/5/2005. La proteína H6 puede ser de la cepa A/Cerceta/Hong Kong/W312/97 (H6N1). La proteína H7 puede ser de la cepa A/Equino/Praga/56 (H7N7), o H7 A/Hangzhou/1/2013, A/Anhui/1/2013 (H7N9) o A/Shanghai/2/2013 (H7N9). La proteína H9 puede ser de la cepa A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). La proteína HA puede provenir de un virus de la influenza que puede ser un virus tipo B, que incluye virus similar a B/Malasia/2506/2004, B/Florida/4/2006, B/Brisbane/60/08, B/Massachusetts/2/2012 (linaje de Yamagata) o B/Wisconsin/1/2010 (linaje de Yamagata). Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos de las proteínas HA de los subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 o B incluyen secuencias como se describe en los documentos WO 2009/009876, WO 2009/076778, WO 2010/003225. La proteína HA del virus de la influenza puede ser H5 Indonesia.

La HA puede comprender un péptido señal nativo o no nativo; el péptido señal no nativo puede ser de origen vegetal. Por ejemplo, el péptido señal puede ser un péptido señal de proteína disulfuro isomerasa (PDI). El péptido señal nativo puede corresponder al de la hemaglutinina que se expresa o puede corresponder a una segunda hemaglutinina.

En la presente descripción se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias que codifican una proteína HA. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además una o más regiones reguladoras unidas operativamente a la secuencia que codifica una proteína HA. Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender una secuencia que codifica una H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16 o HA de influenza tipo B. Por ejemplo, la proteína HA codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser un subtipo H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9, un HA de tipo B. La proteína H1 codificada por el ácido nucleico puede ser de la cepa A/Nuevo Caledonia/20/99 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Islands Salomón 3/2006 (H1N1), A/California/04/2009 (H1N1) o A/California/07/2009 (H1N1). La proteína H3 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), A/Victoria/361/2011 (H3N2), A/Texas/50/2012 (H3N2), A/Hawaii/22/2012 (H3N2), A/Nueva York/39/2012 (H3N2) o A/Perth/16/2009 (H3N2). La proteína H2 codificada por la

molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Singapur/1/57 (H2N2). La proteína H5 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser la cepa A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) o A/Indonesia/5/2005. La proteína H6 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Cerceta/Hong-Kong/W312/97 (H6N1). La proteína H7 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Equino/Praga/56 (H7N7) o H7 A/Hangzhou/1/2013, A/Anhui/1/2013 (H7N9) o A/Shanghai/2/2013 (H7N9). Además, la proteína H9 codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de la cepa A/Hong Kong/1073/99 (H9N2). La proteína HA codificada por la molécula de ácido nucleico puede ser de un virus de la influenza tipo B, que incluye virus similar a B/Malasia/2506/2004, B/Florida/4/2006, B/Brisbane/60/08, B/Massachusetts/2/2012 (linaje Yamagata) o B/Wisconsin/1/2010 (linaje Yamagata). Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos de las proteínas HA de los subtipos H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9 o B incluyen secuencias como se describe en los documentos WO 2009/009876, WO 2009/076778, WO 2010/003225. La proteína HA del virus de la influenza puede ser H5 Indonesia.

La materia vegetal, en forma de material o tejido vegetal, puede suministrarse por vía oral a un sujeto. La materia vegetal puede administrarse como parte de un suplemento dietético, junto con otros alimentos o encapsulada. La materia o tejido vegetal también puede concentrarse para mejorar o aumentar la palatabilidad, o proporcionarse junto con otros materiales, ingredientes o excipientes farmacéuticos, según sea necesario.

Se contempla que una planta que comprende la proteína de interés puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, un animal o un ser humano, en una variedad de formas en dependencia de la necesidad y la situación. Por ejemplo, la proteína de interés obtenida de la planta puede extraerse antes de su uso en forma cruda, parcialmente purificada o purificada. Si la proteína se va a purificar, entonces puede producirse en plantas comestibles o no comestibles. Además, si la proteína se administra por vía oral, el tejido vegetal puede cosecharse y suministrarse directamente al sujeto, o el tejido cosechado puede secarse antes de la alimentación, o se puede permitir que un animal paste de la planta sin que tenga lugar una cosecha previa. Los tejidos vegetales cosechados pueden proporcionarse como un suplemento alimenticio dentro del pienso animal. Si el tejido vegetal se suministra a un animal con poco o ningún procesamiento adicional, se prefiere que el tejido vegetal que se administra sea comestible.

Tabla 1: Listado de secuencias:

| SEQ ID NO: | Descripción | SEQ ID NO: | Descripción |
|------------|--|------------|---|
| 1 | Cebador IF-PDI.S1+3c | 4 | Secuencia de nucleótidos de la construcción 1191 (Figura 15) |
| 2 | Primer IF-H1cTMCT.S1-4r | 5 | Secuencia de nucleótidos del casete 484 PDISP/H1 Calf (Figura 16) |
| 3 | Secuencia de nucleótidos de PDISP/H1 California. | 6 | Secuencia de aminoácidos de PDISP/H1 Calf |

EJEMPLOS

Ejemplo 1: A-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H1 California/NOS (Construcción número 484)

Una secuencia que codifica H1 de Influenza A/California/7/2009 en la que el péptido señal nativo se ha reemplazado con el de la proteína disulfuro isomerasa de la alfalfa (PDISP/H1 California) se clonó en el casete de expresión 2X35S-CPMV-HT-NOS con el uso del siguiente método basado en PCR. Un fragmento que contenía la secuencia codificante de PDISP/H1 California se amplificó con el uso de los cebadores IF-PDI.S1+3c (Figura 12A, SEQ ID NO: 1) e IF-H1cTMCT.S1-4r (Figura 12B, SEQ ID NO: 2), con el uso de la secuencia PDISP/H1 California (Figura 13, SEQ ID NO: 3) como plantilla. El producto de PCR se clonó en el sistema de expresión 2X35S/CP-MV-HT/NOS con el uso del sistema de clonación In-Fusion (Clontech, Mountain View, CA). La construcción número 1191 (Figura 14) se digirió con las enzimas de restricción SacII y StuI y el plásmido linealizado se usó para la reacción de ensamblaje In-Fusion. La construcción número 1191 es un plásmido aceptor destinado a la clonación "In Fusion" de genes de interés en un casete de expresión basado en CPMV-HT. También incorpora una construcción génica para la coexpresión del supresor de silenciamiento de PBSV T19V bajo el promotor y terminador del gen de plastocianina de la alfalfa. La cadena principal es un plásmido binario pCAMBIA y la secuencia desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t se presenta en la Figura 15 (SEQ ID NO: 4). A la construcción resultante se le asignó el número 484 (Figura 16, SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos de la H1 madura de Influenza A/California/7/2009 fusionada con PDISP se presenta en la Figura 17 (SEQ ID NO: 6). Una representación del plásmido 484 se presenta en la Figura 18.

Ejemplo 2: Transfección de Agrobacterium

La cepa de Agrobacterium AGL1 se transfectó por electroporación con las construcciones de ADN con el uso de los métodos descritos por D'Acoust y otros 2008 (Plant Biotechnology Journal 6:930-940). Las Agrobacterias transfectadas se cultivaron en medio YEB suplementado con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 10 mM, acetosiringona 20 µM, kanamicina 50 µg/ml y 25 µg/ml de carbenicilina pH 5,6 a una DO600 entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de Agrobacterium se centrifugaron antes de su uso y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl2 10 mM y MES 10 mM pH 5,6).

Preparación de biomasa vegetal, inóculo y agroinfiltración.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron a partir de semillas en bandejas llenas con un sustrato de turba comercial. Se permitió que las plantas crecieran en el invernadero bajo un fotoperiodo de 16/8 y un régimen de temperatura de 28 °C de día/24 °C de noche. Tres semanas después de la siembra, se escogieron plántulas individuales, se trasplantaron en macetas y se dejaron crecer en el invernadero durante tres semanas adicionales en las mismas condiciones ambientales.

5

Las agrobacterias transfectadas con cada construcción se cultivaron en un medio YEB suplementado con ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 10 mM, acetosiringona 20 µM, kanamicina 50 µg/ml y 25 µg/ml de carbenicilina pH 5,6 hasta alcanzar un DO600 entre 0,6 y 1,6. Las suspensiones de *Agrobacterium* se centrifugaron antes de su uso y se resuspendieron en medio de infiltración (MgCl₂ 10 mM y MES 10 mM pH 5,6) y se almacenaron durante la noche a 4 °C. El día de la infiltración, los lotes de cultivo se diluyeron en 2,5 volúmenes de cultivo y se permitió que se calentaran antes de su uso. Se colocaron plantas completas de *N. benthamiana* boca abajo en la suspensión bacteriana en un tanque de acero inoxidable hermético a un vacío de 20-40 Torr durante 2 min. Las plantas infiltradas se colocaron en una cámara Conviron PGR15 CMP 5090 (Conviron, Winnipeg MB, Canadá) durante un período de incubación de 6-7 días hasta la cosecha.

10

15

Ejemplo 3: Procedimientos analíticos

Las proteínas foliares se extrajeron de las hojas y pecíolos primarios, P1, P2, P3 y de las hojas y pecíolos secundarios, S1, S2, S3, en base al esquema proporcionado en la Figura 7. Las hojas cosechadas se pesaron para determinar la producción de biomasa en base al tejido foliar fresco. Las proteínas foliares se extrajeron en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contenía NaCl 500 mM, PMSF 1 mM y metabisulfito de sodio al 0,04 % (p/v) (tampón de extracción), con el uso de un homogeneizador Omni bead Ruptor 24 y esferas de circonio de 2,8 mm (OMNI International, Kennesaw GA, Estados Unidos) para la ruptura del tejido foliar. El tejido foliar cosechado se congeló a -80 °C y se trituró en nitrógeno líquido, se diluyó en tampón de extracción (1,5 g de polvo de hojas frescas en 3 ml de tampón de extracción que contenía 10 esferas de circonio) y se homogeneizó en el homogeneizador Omni bead Ruptor de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se transfirió un ml de mezcla en un microtubo de 1,5 ml y se centrifugó a 20.000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se recuperó para su posterior análisis. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó de acuerdo con Bradford (Bradford MM (1976) *Analytical Biochemistry* 72, 248-254), con albúmina de suero bovino como estándar de proteína. Las muestras se mantuvieron en hielo o se congelaron a -80 °C antes del ensayo de hemaglutinación.

20

25

30

El ensayo de hemaglutinación se basó en un método descrito por Nayak y Reichl (2004). Brevemente, se prepararon diluciones dobles en serie de las muestras de prueba (100 µl) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo en V que contenían 100 µl de PBS, dejando 100 µl de muestra diluida por pocillo. Se añadieron cien microlitros de una suspensión de glóbulos rojos de pavo al 0,25 % (Bio Link Inc., Syracuse, NY; para todas las cepas B, H1, H5 y H7) o una suspensión de glóbulos rojos de cobaya al 0,5 % (para H3) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. El recíproco de la dilución más alta que muestra hemaglutinación completa se registró como actividad de HA.

35

El ARN foliar se extrajo de las hojas y pecíolos primarios, P1, P2, P3 y de las hojas y pecíolos secundarios, S1, S2, S3, en base al esquema proporcionado en la Figura 7. Los transcritos de ARNm de la secuencia codificante de HA se analizaron mediante RT PCR en tiempo real con el uso de un aparato de PCR en tiempo real ABI PRISM 7500 Fast, versión del sistema 2.0.1 (Applied Biosystems). El ARN total se extrajo como se describió anteriormente por Robert y otros (PLoS One, 8: e70203) con el uso del kit de Qiagen RNeasy plant mini (Qiagen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras de ARN se trataron con DNasa I (Roche Diagnostics) para eliminar el ADN contaminante y se evaluó su calidad y cantidad con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington DE, Estados Unidos). El ADNc de primera cadena se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total con el uso de 4 unidades de transcriptasa inversa Omniscript (Qiagen) y 1 µM de nucleótidos oligo-dT(15) (Roche). Las mezclas de PCR contenían 10 µl de mezcla maestra de PCR Fast SYBR Green (Applied Biosystems), 2 µl de plantilla de ADNc y 2,5 µl de cada uno de los cebadores directos e inversos apropiados a una concentración final de 625 nM. Se incluyó un control de mezcla sin plantilla en cada placa de 96 pocillos. Las rondas de amplificación consistieron en una etapa de desnaturalización de 20 s a 95 °C, seguido de 40 ciclos de dos etapas de 3 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. Se realizó un análisis de la curva de disociación después de la amplificación con la mezcla maestra SYBR Green, y el ciclo umbral de cada muestra se comparó después con una curva estándar de ADN diseñada para cada par de cebadores. Se generaron curvas estándar con 2 µl de plantilla de ADNc siguiendo el protocolo habitual de Taq polimerasa de NEB (New England Biolabs). Los productos de amplificación se purificaron con el uso del kit Illustra GFX (GE Healthcare) y se crearon curvas estándar de ADN con diluciones en serie de los productos de PCR purificados en agua libre de nucleasas (de 107 a 102 copias por µl). Los datos de Ct se representaron gráficamente contra el número correspondiente de copias de transcritos. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo por duplicado.

40

45

50

55

60

Ejemplo 4: Ensayos de iluminación

Se usaron diferentes regímenes de iluminación para la producción de biomasa antes de la agroinfiltración, con el uso de condiciones estándar de cámara de cultivo (como se define en el Ejemplo 2, arriba) como un comparador de referencia. Las plántulas de tres semanas de edad se trasplantaron en macetas como se describió en el Ejemplo 2, arriba, y se dejó que produjeran biomasa durante tres semanas en el invernadero (Figuras 1-4) o en cámaras de cultivo Conviron PGW36

65

3224 (Figuras 5 y 6). Después, las plantas se agroinfiltraron con una cepa de *Agrobacterium* transformada con la construcción 484 para la expresión de H1 de Influenza A/California/7/2009 (HA; Ejemplo 1), se dejó que expresaran la proteína de interés (HA) durante 6-7 días y se evaluó la producción de biomasa y HA como se describió en los Ejemplos 2 y 3. Los tratamientos de luz en los ensayos en invernadero y en cámara de cultivo implicaron diferentes dispositivos de iluminación, que incluyen lámparas de sodio a alta presión (HPS) de 1000 W (Philips), lámparas de haluro metálico (MH) de 1000 W (Sylvania) y lámparas LED GreenPower (Phillips)

Para los ensayos en invernadero, se usaron los siguientes regímenes de iluminación:

- (1) fotoperiodo de 16 h de día/8 h de noche, intensidad de luz de 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$;
- (2) fotoperiodo de 16 h de día/8 h de noche, intensidad de luz de 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$;
- (3) fotoperiodo de 24 h de día, intensidad de luz de 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$;
- (4) fotoperiodo de 24 h de día, intensidad de luz de 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$.

Para los ensayos en cámara de cultivo, se usaron los siguientes regímenes de iluminación:

- (1) fotoperiodo de 24 h de día, intensidad de luz de 175 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ (control de intensidad de luz baja);
- (2) fotoperiodo de 24 h de día, intensidad de luz de 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ (ensayo de intensidad de luz alta).

Los resultados de los ensayos se muestran en las Figuras 1 - 6.

Con respecto a los ensayos en invernadero (Figura 1-4), con un aumento en la intensidad de luz (de 80 a 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$), se observó un aumento correspondiente en la biomasa total de hojas para las plantas que estuvieron expuestas a un fotoperiodo de 16 h o 24 h (Figura 1). Además, la proporción de biomasa de hojas secundarias respecto a biomasa de hojas primarias aumentó junto con el aumento en el fotoperiodo y con el aumento en la intensidad de luz de una relación de biomasa de hojas secundarias respecto a biomasa de hojas primarias (S/P) de: relación S/P de 0,27:1 para el tratamiento de 16 h 80, relación S/P de 0,39:1 para el tratamiento de 16 h 160; relación S/P de 0,44:1 para el tratamiento de 24 h 80 y relación S/P de 0,53:1 para el tratamiento de 24 h 160. Lo que demuestra un aumento en la cantidad de biomasa de hojas secundarias resultante de estos dos tratamientos de luz (aumento de la intensidad de luz y aumento del fotoperiodo).

El rendimiento de la proteína de interés (HA) también aumenta en la biomasa de hojas secundarias como resultado de los tratamientos de intensidad de luz y fotoperiodo (Figuras 2, 3 y 4). Además, la relación de rendimiento de proteína HA obtenida de la biomasa de hojas secundarias respecto a la biomasa de hojas primarias (relación HA S/P) aumentó de la relación HA S/P de 0,33:1 para el tratamiento de 16 h 80, la relación HA S/P de 0,35:1 para el tratamiento de 16 h 160; la relación HA S/P de 0,62:1 para el tratamiento de 24 h 80 y la relación HA S/P de 0,89:1 para el tratamiento de 24 h 160. Lo que demuestra un aumento en el rendimiento de la proteína de interés en la biomasa de hojas secundarias como resultado de estos dos tratamientos de luz (aumento de la intensidad de luz y aumento del fotoperiodo) El rendimiento de una proteína de interés de la biomasa total de hojas (primaria y secundaria) aumentó con el aumento de la intensidad de luz y el aumento del fotoperiodo (Figuras 3 y 4).

Se obtuvieron resultados similares con los ensayos en cámara de cultivo (Figuras 5 y 6, y Tabla 2). Como se muestra en la Figura 5, con un aumento en la intensidad de luz, hubo un aumento correspondiente en la biomasa total de hojas. También se observó un aumento en el rendimiento de la HA obtenida de la biomasa de hojas secundarias en comparación con el rendimiento de la HA obtenida de la biomasa de hojas primarias (Figura 6). Esto se asoció con un mayor número de transcritos de ARNm para la biosíntesis de HA en las hojas secundarias más viejas (S3) en comparación con el número correspondiente en las hojas primarias más viejas (P3) (Tabla 2).

Estos datos demuestran colectivamente que al aumentar el crecimiento de la biomasa de hojas secundarias antes de la infiltración y la cosecha se obtiene un aumento en la biomasa de hojas secundarias, junto con un aumento en la tasa de biosíntesis y el rendimiento de una proteína de interés. Debe entenderse que la proteína de interés puede obtenerse a partir de la biomasa de hojas secundarias, la biomasa de hojas primarias, o tanto de la biomasa de hojas secundarias como de la biomasa de hojas primarias.

ES 2 787 042 T3

Tabla 2: transcritos de ARNm de HA en hojas jóvenes (P1), maduras (P2) y viejas (P3) del tallo principal y en hojas jóvenes (S1), maduras (S2) y viejas (S3) de tallos secundarios, de plantas cultivadas en cámara de cultivo.

| Unidad de producción | Transcritos de HA (Millones de copias/mg de peso fresco de hojas) |
|----------------------|---|
| P1 | 4,57 ± 1,68 a |
| S1 | 3,95 ± 1,43 a |
| P2 | 3,20 ± 0,84 ab |
| S2 | 3,39 ± 1,35 b |
| S3 | 1,96 ± 0,77 c |
| P3 | 0,47 ± 0,22 d |

Ejemplo 5: Tratamientos físicos de despunte después del trasplante de las plántulas

La importancia relativa de los brotes secundarios sobre la biomasa total cosechada se incrementó al eliminar la yema apical (tallo principal) 40 (ver 'A', en la Figura 7) 5, 7 o 12 días después del trasplante de las plántulas, correspondientes, respectivamente, a 16, 14 o 9 días antes de la infiltración. Las plántulas de tres semanas de edad se trasplantaron en macetas, se dejó que produjeran biomasa durante una semana en el invernadero y el ápice se eliminó para producir plantas podadas. Las plantas podadas se dejaron en el invernadero durante 16, 14 o 9 días adicionales. Después, las plantas podadas se agroinfiltraron con una cepa de *Agrobacterium* transformada con la construcción 484 para la expresión de H1 de Influenza A/California/7/2009 (HA; Ejemplo 1)) como se describió en el Ejemplo 2, y se colocaron en una cámara Conviron PGR15 CMP 5090 (en las condiciones definidas en el Ejemplo 2) y se dejaron durante 6-7 días. Después de este período de tiempo, se evaluó la biomasa de las plantas podadas como se describió en el Ejemplo 3. Después de este período de tiempo, se evaluó la producción de biomasa y HA en las plantas podadas como se describió en el Ejemplo 3. Se usaron las siguientes condiciones para el ensayo: un fotoperíodo de 24 h de día/0 h de noche, una intensidad de luz de 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ proporcionada por lámparas HPS (Philips) y MH (Sylvania), un régimen de temperatura de 28 °C de día/24 °C de noche, y una densidad de dosel de plantas de 33 plantas/ m^2 .

Los resultados de la poda de la yema apical, antes de la transformación de la planta, en la biomasa vegetal se presentan en la Tabla 3 y la Figura 8. La poda no alteró la biomasa total de hojas (es decir, la biomasa de hojas primarias y secundarias combinadas), excepto por el despunte temprano 5 días después del trasplante que afecta significativamente el crecimiento de la planta (Figura 8). Como resultado de la poda, la proporción de la biomasa de hojas cambió con la biomasa de hojas secundarias (ver la Figura 8 para la biomasa cosechada después de la incubación de HA). Por ejemplo, la biomasa de hojas secundarias determinada antes de la infiltración aumentó de 10,4 g en plantas de control (no podadas) a 23,0 g en plantas podadas, mientras que la biomasa de hojas primarias disminuyó de 26,3 g (control) a 14,5 g (plantas podadas), para un aumento de la relación de biomasa de hojas secundarias respecto a biomasa de hojas primarias de 0,4:1 a 1,6:1.

Estos datos demuestran colectivamente que el despunte mecánico después del trasplante de las plántulas es una forma de aumentar la importancia relativa de la biomasa de hojas secundarias a escala de la planta completa, antes de la infiltración para mejorar la producción de una proteína de interés. Debe entenderse que la proteína de interés puede obtenerse a partir de la biomasa de hojas secundarias, la biomasa de hojas primarias, o tanto de la biomasa de hojas secundarias como de la biomasa de hojas primarias.

Tabla 3: Efecto de la poda 7 días después del trasplante de las plántulas sobre la biomasa de hojas primarias, la biomasa de hojas secundarias y la biomasa total de hojas (g de peso fresco).

| | Promedio de biomasa total de hojas | Promedio de biomasa de hojas primarias | Promedio de biomasa de hojas secundarias |
|--------------------|------------------------------------|--|--|
| Plantas de control | 36,7 ± 4,0 | 26,3 ± 2,5 | 10,4 ± 1,9 |
| Plantas podadas | 37,5 ± 6,0 | 14,5 ± 4,6 | 23,0 ± 3,4 |

Ejemplo 6: Tratamientos químicos con la hormona sintética bencilaminopurina (BAP) después del trasplante de las plántulas

La importancia relativa de los brotes secundarios sobre la biomasa total cosechada se incrementó mediante el tratamiento de las plantas con la hormona vegetal sintética bencilaminopurina (BAP) 7 o 12 días después del trasplante de las plántulas, es decir, 14 o 9 días antes de la infiltración para la expresión de HA. Las plántulas de tres semanas de edad se trasplantaron en macetas, se dejó que produjeran biomasa durante 7 o 12 días en el invernadero y se trataron después de 7 y/o 12 días con la hormona sintética a dosis de trabajo de 100 ppm, 500 ppm o 1000 ppm en agua. Las plantas tratadas se dejaron en el invernadero durante 14 o 9 días adicionales y después se agroinfiltraron con una cepa de *Agrobacterium* transformada con la construcción 484 para la expresión de H1 de Influenza A/California/7/2009 (HA; Ejemplo 1)) como se describió en el Ejemplo 2, y se colocaron en una cámara Conviron PGR15 CMP 5090 (en las condiciones definidas en el Ejemplo 2) y se dejaron durante 6-7 días. Después de este período de tiempo, se evaluó la producción de biomasa y HA de las plantas tratadas como se describió en el Ejemplo 3. Se usaron las siguientes

condiciones para el ensayo: un fotoperiodo de 24 h de día/0 h de noche, una intensidad de luz de 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ s proporcionada por lámparas HPS (Philips) y MH (Sylvania), un régimen de temperatura de 28 °C de día/24 °C de noche y una densidad de dosel de plantas de 33 plantas/ m^2 .

5 Los resultados del tratamiento de plantas con BAP, antes de la transformación de la planta, en la biomasa vegetal y el rendimiento de HA se presentan en las Figuras 9, 10 y 11. El tratamiento con BAP tuvo poco efecto sobre la biomasa primaria pero tuvo un efecto positivo significativo sobre la producción de biomasa secundaria, excepto por el tratamiento de 1000 ppm que no mostró un impacto positivo (Figura 9). Por ejemplo, se cosechó ca. 22 g de biomasa de hojas secundarias de plantas tratadas con 500 ppm 7 días después del trasplante en comparación con ca. 16 g de plantas de control (no tratadas), para un aumento relativo de aproximadamente 37,5 % en comparación con un aumento de menos de 10 % para la biomasa primaria.

15 El aumento de la proporción de biomasa secundaria en las plantas tratadas con BAP se asoció con un aumento general consolidado de la producción de HA por g de peso fresco (Figura 10) y un consiguiente aumento del rendimiento total de HA por planta (Figura 11). Por ejemplo, el rendimiento de HA por g de peso fresco en plantas de control (no tratadas) fue menor que 200 000 unidades en comparación con más de 300 000 unidades por g de peso fresco en plantas tratadas con BAP a 500 ppm después de 7 y 12 días (Figura 10), para un aumento del rendimiento total por planta de 45-50 %.

20 Estos datos demuestran colectivamente la eficacia de los tratamientos después del trasplante de las plántulas con la citoquinina sintética BAP para aumentar la importancia relativa de la biomasa de hojas secundarias a escala de la planta completa antes de la infiltración y para mejorar la producción de una proteína de interés después de la infiltración. Debe entenderse que la proteína de interés puede obtenerse a partir de la biomasa de hojas secundarias, la biomasa de hojas primarias o tanto de la biomasa de hojas secundarias como de la biomasa de hojas primarias.

25 Listado de secuencias

<110> Michaud, Dominique
 D Aoust, Marc-Andre
 Martel, Michele
 30 Pepin, Steeve
 Ethier, Gilbert
 Bechtold, Nicole
 Goulet, Marie-Claire
 Gagne, Marielle
 35 Gaudreau, Linda
 Gosselin, Andre

<120> MODIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS EN PLANTAS

40 <130> V87783wo

<150> US 62/023,718
 <151> 2014-07-11

45 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador IF-PDI.S1+3c

<400> 1
 aaattgtcg ggccatggc gaaaacgtt gcgatttcg gcttattg 48

60 <210> 2
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Cebador IF-H1cTMCT.S1-4r

ES 2 787 042 T3

<400> 2
actaaagaaa ataggccttt aaatacatat tctacactgt agagac 46

5 <210> 3
<211> 1722
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> PDISP/H1 California

<400> 3

15 atggcgaaaa acgttgcgat tttcggctta ttgttttctc ttcttggtt ggttccttct 60
cagatcttcg ctgacacatt atgtataggt tatcatgca acaattcaac agacactgta 120
gacacagtac tagaaaagaa tgtaacagta acacactctg ttaaccttct agaagacaag 180
20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 787 042 T3

cataacggga aactatgcaa actaagaggg gtagcccat tgcatttggg taaatgtaac 240
 attgctggct ggatcctggg aaatccagag tgtgaatcac tctccacagc aagctcatgg 300
 5 tcctacattg tggaaacacc tagttcagac aatggaacgt gttaccagc agatttcatc 360
 gattatgagg agctaagaga gcaattgagc tcagtgtcat catttgaaag gtttgagata 420
 tcccccaaga caagttcatg gcccaatcat gactcgaaca aagggtgtaac ggcagcatgt 480
 10 cctcatgctg gagcaaaaag cttctacaaa aatttaatat ggctagttaa aaaaggaaat 540
 tcatacccaa agctcagcaa atcctacatt aatgataaag ggaaagaagt cctcgtgcta 600
 tggggcattc accatccatc tactagtgtc gaccaacaaa gtctctatca gaatgcagat 660
 15 gcatatgttt ttgtggggtc atcaagatac agcaagaagt tcaagccgga aatagcaata 720
 agacccaaag tgagggatca agaagggaga atgaactatt actggacact agtagagccg 780
 20 ggagacaaaa taacattcga agcaactgga aatctagtgg taccgagata tgcattcgca 840
 atggaaagaa atgctggatc tggattatc atttcagata caccagtcca cgattgcaat 900
 acaacttgtc aaacacccaa ggggtgctata aacaccagcc tcccatttca gaatatacat 960
 25 ccgatcacia ttggaaaatg tccaaaatat gtaaaaagca caaaattgag actggccaca 1020
 ggattgagga atatcccgtc tattcaatct agaggactat ttggggccat tgccggtttc 1080
 attgaagggg ggtggacagg gatggtagat ggatggtacg gttatcacca tcaaaatgag 1140
 30 caggggtcag gatatgcagc cgacctgaag agcacacaga atgccattga cgagattact 1200
 aacaaagtaa attctgttat tgaaaagatg aatacacagt tcacagcagt aggtaaagag 1260
 35 ttcaaccacc tggaaaaaag aatagagaat ttaaataaaa aagttgatga tggtttcctg 1320
 gacatttggg cttacaatgc cgaactgttg gttctattgg aaaatgaaag aactttggac 1380
 taccacgatt caaatgtgaa gaacttatat gaaaaggtaa gaagccagct aaaaaacaat 1440
 40 gccaaagaaa ttggaaacgg ctgctttgaa ttttaccaca aatgagataa cacgtgcatg 1500
 gaaagtgtca aaaatgggac ttatgactac caaaataact cagaggaagc aaaattaaac 1560
 agagaagaaa tagatggggg aaagctggaa tcaacaagga tttaccagat tttggcgatc 1620
 45 tattcaactg tcgccagttc attggtactg gtagtctccc tgggggcaat cagtttctgg 1680
 atgtgtctca atgggtctct acagtgtaga atatgtattt aa 1722

 <210> 4
 50 <211> 4903
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Construcción 1191 2X35S/CPMV-HT/NOS

 <400> 4

 60 tggcaggata tattgtgggtg taacaaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 60

 65

ES 2 787 042 T3

gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga atccccggct ggtatattta tatgttgtca 120
 aataactcaa aaaccataaa agtttaagtt agcaagtgtg tacattttta cttgaacaaa 180
 5 aatattcacc tactactggt ataaatcatt attaaacatt agagtaaaga aatatggatg 240
 ataagaacaa gagtagtgat attttgacaa caattttggt gcaacatttg agaaaatttt 300
 gttgttctct cttttcattg gtcaaaaaca atagagagag aaaaaggaag agggagaata 360
 10 aaaaacataat gtgagatga gagagaaagt tgtacaaaag ttgtaccaa atagttgtac 420
 aaatatcatt gaggaatttg acaaaagcta cacaaaataag ggtaattgc tgtaataaaa 480
 taaggatgac gcattagaga gatgtacat tagagaattt ttggcaagtc attaaaaaga 540
 15 aagaataaat tatttttaaa attaaaagtt gagtcatttg attaaacatg tgattattta 600
 atgaattgat gaaagagttg gattaaagtt gtattagtaa ttagaatttg gtgtcaaatt 660
 taatttgaca tttgatcttt tcctatata tgccccatag agtcagttaa ctcatTTTTA 720
 20 tatttcatag atcaataag agaaataacg gtatattaat ccctccaaa aaaaaaacg 780
 gtatatttac taaaaatct aagccacgta ggaggataac aggatccccg taggaggata 840
 25 acatccaatc caaccaatca caacaatcct gatgagataa cccacttta gcccacgcat 900
 ctgtggcaca tctacattat ctaaatcaca cattctcca cacatctgag ccacacaaaa 960
 accaatccac atctttatca cccattctat aaaaaatcac actttgtgag tctacacttt 1020
 30 gattcccttc aaacacatac aaagagaaga gactaattaa ttaattaaatc atcttgagag 1080
 aaaatggaac gagctataca aggaaacgac gctagggaac aagctaacag tgaacgttgg 1140
 gatggaggat caggaggtac cacttctccc ttcaaacttc ctgacgaaag tccgagttgg 1200
 35 actgagtggc ggctacataa cgatgagacg aattcgaatc aagataatcc ccttggtttc 1260
 aaggaaagct ggggttctcg gaaagttgta tttaagagat atctcagata cgacaggacg 1320
 gaagcttcac tgcacagagt ccttgatctc tggacgggag attcggttaa ctatgcagca 1380
 40 tctcgatttt tcggtttoga ccagatcggg tgtacctata gtattcgggt tcgaggagtt 1440
 agtatcaccg tttctggagg gtcgcgaact cttcagatc tctgtgagat ggcaattcgg 1500
 45 tctaagcaag aactgctaca gcttgcccca atcgaagtgg aaagtaatgt atcaagagga 1560
 tgcctgaag gtactcaaac cttcgaaaaa gaaagcgagt aagttaaat gcttctcgt 1620
 ctctatttta taatatggtt tgttattggt aattttgttc ttgtagaaga gcttaattaa 1680
 50 tcgttggtgt tatgaaatac tatttgatg agatgaactg gtgtaatgta attcatttac 1740
 ataagtggag tcagaatcag aatgtttcct ccataactaa ctagacatga agacctgccg 1800
 cgtacaattg tcttatattt gaacaactaa aattgaacat cttttgccac aactttataa 1860
 55 gtggttaata tagctcaaat atatgggtcaa gttcaataga ttaataatgg aatatcagt 1920

60

65

ES 2 787 042 T3

5 t atc gaaatt c attaacaat caacttaacg ttattaacta ctaat t t t t at atcatcccct 1980
 t tgataaatg atagtaacacc aattaggaag gagcatgctc gcctaggaga ttgtcgtttc 2040
 c cgccttcag tttgcaagct gctctagccg tgtagccaat acgcaaaccg cctctccccg 2100
 c cgcgttggga attactagcg cgtgtcgaca agcttgc atg c c g g t c a a c a t g g t g g a g c a 2160
 c gacacactt gtctactcca aaaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggcaat 2220
 10 t gtagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gccagctat 2280
 c t g t c a c t t t t a t t g t g a a g a t a g t g g a a a g g a a g g t g g c t c c t a c a a a t g c c a t c a t t g 2340
 c g a t a a a g g a a a g g c c a t c g t t g a a g a t g c c t c t g c c g a c a g t g g t c c c a a g a t g g a c c 2400
 15 c c c a c c c a c g a g g a g c a t c g t g g a a a a g a a g a c g t t c c a a c a c g t c t t c a a a g c a a g t 2460
 g g a t t g a t g t g a t a a c a t g g t g g a g c a c a c a c t t g t c t a c t c c a a a a a t a t c a a a g a 2520
 t a c a g t c t c a g a a g a c c a a a g g g c a a t t g a g a c t t t t c a a c a a g g g t a a t a t c c g g a a a 2580
 20 c c t c c t c g g a t t c c a t t g c c a g c t a t c t g t c a c t t t a t t g t g a a g a t a g t g g a a a g g a 2640
 a g g t g g c t c c t a c a a a t g c c a t c a t t g c g a t a a a g g a a a g g c c a t c g t t g a a g a t g c c t c 2700
 t g c c g a c a c g t g g t c c c a a a g a t g g a c c c c c a c c a g a g g a g c a t c g t g g a a a a a g a g a 2760
 25 c g t t c c a a c c a c g t c t t c a a a g c a a g t g g a t t g a t g t g a t a t c t c c a c t g a c g t a a g g g a 2820
 t g a c g c a c a a t c c c a c t a t c c t t o g c a a g a c c o t t c t c t a t a t a a g g a a g t t c a t t t c a 2880
 t t t g g a g a g g t a t t a a a a a t c t t a a t a g g t t t g a t a a a a g c g a a c g t g g g g a a a c c c g a a 2940
 30 c c a a a c c t t c t t c t a a a a c t c t c t c t c a t c t c t o t t a a a g c a a a c t t c t c t c t t g t c t t t c 3000
 t t g c g t g a g c g a t c t t c a a c g t t g t c a g a t c g t g c t t c g g c a c c a g t a c a c g t t t t c t t 3060
 35 t c a c t g a a g c g a a a t c a a a g a t c t c t t t g t g g a c a c g t a g t g c g g c c c a t t a a a t a a c g 3120
 t g t a c t t g t c c t a t t c t t g t c g g t g t g g t c t t g g g a a a a g a a a g c t t g c t g g a g g c t g c t 3180
 g t t c a g c c c c a t a c a t t a c t t g t t a c g a t t c t g c t g a c t t t c g g c g g g t g c a a t a t c t c t 3240
 40 a c t t c t g o t t g a c g a g g t a t t g t t g c c t g t a c t t c t t t c t t c t t c t t g c t g a t t g g t 3300
 t c t a t a a g a a a t c t a g t a t t t t c t t t g a a a c a g a g t t t t c c g t g g t t t t c g a a c t t g g a 3360
 g a a a g a t t g t t a a g c t t c t g t a t a t t c t g c c c a a t t t g t c g g g c c c g c g a t g g c g a a a 3420
 45 a a c g t t g c g a t t t t c g g c t t a t t g t t t t c t c t t c t t g t g t g t t c c t t c t c a g a t c t t c 3480
 g c c t g c a g g c t c c t c a g c c a a a a c g a c a c c c c c a t c t g t c t a t c c a c t g g c c c c t g g a t c 3540
 t g c t g c c c a a a c t a a c t c c a t g g t g a c c c t g g g a t g c c t g t c a a g g g c t a t t t c c c t g a 3600
 50 g c c a g t g a c a g t g a c c t g g a a c t c t g g a t c c c t g t c c a g c g g t g t g c a c a c c t t c c c a g c 3660
 t g t c c t g c a g t c t g a c c t c t a c a c t c t g a g c a g c t c a g t a c t g t c c c c t c c a g c a c c t g 3720
 g c c c a g c g a g a c c g t c a c c t g c a a c g t t g c c c a c c c g g c c a g c a g c a c c a a g g t g g a c a a 3780
 55 g a a a a t t g t g c c c a g g g a t t g t g g t t g t a a g c o t t g c a t a t g t a c a g t c c a g a a g t a t c 3840

60

65

ES 2 787 042 T3

atctgtcttc atcttcccc caaagcccaa ggatgtgctc accattactc tgactoctaa 3900
 ggtcacgtgt gttgtggtag acatcagcaa ggatgatccc gaggtccagt tcagctggtt 3960
 5 tgtagatgat gtggaggtgc acacagctca gacgcaacct cgggaggagc agttcaacag 4020
 cactttccgc tcagtcagtg aacttcccat catgcaccag gactggctca atggcaagga 4080
 gcgatcgctc accatcacca tcaccatcac catcaccatt aaaggcctat tttctttagt 4140
 10 ttgaatttac tgttattcgg tgtgcatttc tatgtttggg gagcggtttt ctgtgctcag 4200
 agtgtgttta ttttatgtaa ttttaatttc ttgtgagctc ctgtttagca ggtcgtccct 4260
 tcagcaagga cacaaaaaga ttttaatttt attaaaaaaa aaaaaaaaaa agaccgggaa 4320
 15 ttcgatatca agcttatcga cctgcagatc gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa 4380
 gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta 4440
 20 agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatggggt tttatgatta 4500
 gagtcccgca attatacatt taatcgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg 4560
 ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatct cttagagtctc aagcttggcg 4620
 25 cgcccacgtg actagtggca ctggccgctg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg 4680
 gcgttaccba acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg 4740
 aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgag cctgaatggc gaatgctaga 4800
 30 gcagcttgag cttggatcag attgtcgttt cccgccttca gtttaacta tcagtgttg 4860
 acaggatata ttggcgggta aacctaagag aaaagagcgt tta 4903
 35 <210> 5
 <211> 3462
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Casete 484 del promotor 2X35S al terminador NOS
 <400> 5
 45 gtcaacatgg tggagcacga cacacttgct tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 60
 gaagacaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 120
 50 ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 180
 taaaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 240
 ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 300
 55 acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat aacatggtgg agcacgacac acttgtctac 360
 tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaagg caattgagac ttttcaacia 420
 agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca ctttattgtg 480
 60
 65

ES 2 787 042 T3

aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggcc 540
 atcgttgaaag atgcctctgc cgacagtggc cccaagatg gacccccacc cacgaggagc 600
 5 atcgttgaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc 660
 tccactgaag taagggatga cgacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata 720
 taaggaagtt catttcattt ggagaggat taaaatctta ataggttttg ataaaagcga 780
 10 acgtggggaa accogaacca aaccttcttc taaactctct ctcatctctc ttaaagcaaa 840
 cttctctctt gtctttcttg cgtgagcgat cttcaacggt gtcagatcgt gcttcggcac 900
 cagtacaacg ttttctttca ctgaagcgaa atcaaagatc tctttgtgga cacgtagtgc 960
 15 ggccgcatata aataacgtgt acttgtccta ttcttgtcgg tgtggtcttg ggaaaagaaa 1020
 gcttgctgga ggctgctgtt cagccccata cattaactgt tacgattctg ctgactttcg 1080
 gcgggtgcaa tatctctact tctgcttgac gaggtattgt tgcctgtact tctttcttct 1140
 20 tcttcttctt gattggttct ataagaaatc tagtattttc tttgaaacag agttttcccg 1200
 tggttttcga acttgagaaa agattgttaa gcttctgtat attctgccca aatttgcgg 1260
 gcccatggcg aaaacgctg cgattttcgg cttattgttt tctcttcttg tgttggttcc 1320
 25 ttctcagatc ttcgctgaca cattatgtat aggttatcat gcgaacaatt caacagacac 1380
 tgtagacaca gtactagaaa agaagtgaac agtaacacac tctgttaacc ttctagaaga 1440
 caagcataac gggaaactat gcaaaactaag aggggtagcc ccattgcatt tgggtaaagt 1500
 30 taacattgct ggctggatcc tgggaaatcc agagtgtgaa tcaactctca cagcaagctc 1560
 atggtcctac attgtgaaa cacctagttc agacaatgga acgtgttacc caggagattt 1620
 catcgattat gaggagctaa gagagcaatt gagctcagt tcatcatttg aaaggtttga 1680
 35 gatattcccc aagacaagtt catggcccaa tcatgactcg acaaagggtg taacggcagc 1740
 atgtcctcat gctggagcaa aaagcttcta caaaaattta atatggctag ttaaaaaagg 1800
 aaattcatac ccaaagctca gcaaatccta cattaatgat aaagggaag aagtcctcgt 1860
 40 gctatggggc atccaccatc catctactag tgctgaccaa caaagtctct atcagaatgc 1920
 agatgcatat gtttttgtgg ggtcatcaag atacagcaag aagttcaagc cggaaatagc 1980
 45 aataagacc aaagtgagg atcaagaagg gagaatgaac tattactgga cactagtaga 2040
 gccgggagac aaaataacat tcgaagcaac tgaaatcta gtggtaccga gatatgcatt 2100
 cgcaatggaa agaaatgctg gatctggtat tatcatttca gatacaccag tccacgattg 2160
 50 caatacaact tgtcaaacac ccaaggggtc tataaacacc agcctcccat ttcagaatat 2220
 acatccgatc acaattggaa aatgtccaaa atatgtaaaa agcacaaaat tgagactggc 2280
 cacaggattg aggaatatcc cgtctattca atctagagga ctatttgggg ccattgccgg 2340
 55 tttcattgaa ggggggtgga cagggatggt agatggatgg tacggttatc accatcaaaa 2400

60

65

ES 2 787 042 T3

5 tgagcagggg tcaggatatg cagccgacct gaagagcaca cagaatgccca ttgacgagat 2460
 tactaacaana gtaaattctg ttattgaaaa gatgaataca cagttcacag cagtaggtaa 2520
 agagttcaac cacctggaaa aaagaataga gaatttaaat aaaaaagttg atgatggttt 2580
 cctggacatt tggacttaca atgccgaact gttggttcta ttggaaaatg aaagaacttt 2640
 ggactaccac gattcaaatg tgaagaactt atatgaaaag gtaagaagcc agctaaaaaa 2700
 10 caatgccaaag gaaattggaa acggctgctt tgaattttac cacaaatgcg ataacacgtg 2760
 catggaaagt gtcaaaaatg ggacttatga ctacccaaaa tactcagagg aagcaaaatt 2820
 aaacagagaa gaaatagatg gggtaaagct ggaatcaaca aggatttacc agattttggc 2880
 15 gatctattca actgtcgcca gttcattggt actggtagtc tccctggggg caatcagttt 2940
 ctggatgtgc tctaattgggt ctctacagtg tagaatatgt atttaaagcc ctattttctt 3000
 tagtttgaat ttactgttat tccgtgtgca tttctatggt tgggtgagcgg tttctgtgc 3060
 20 tcagagtgtg tttattttat gtaatttaat ttctttgtga gctcctgttt agcaggtcgt 3120
 cccttcagca aggacacaaa aagattttaa ttttattaaa aaaaaaaaaa aaaaagaccg 3180
 25 ggaattcgat atcaagctta tgcacctgca gatcgttcaa acatttgcca ataaagtttc 3240
 ttaagattga atcctgttgc cggcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac 3300
 gtaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg 3360
 30 attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac 3420
 taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag at 3462

35 <210> 6
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de PDISP/H1 California

<400> 6

45 Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Val
 1 5 10 15
 50 Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His
 20 25 30
 Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val
 35 40 45
 55 Thr Val Thr His Ser Val Asn Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys
 50 55 60

60

65

ES 2 787 042 T3

Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn
 65 70 75 80
 5 Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly
 10 100 105 110
 Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln
 115 120 125
 15 Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr
 130 135 140
 Ser Ser Trp Pro Asn His Asp Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys
 20 145 150 155 160
 Pro His Ala Gly Ala Lys Ser Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val
 165 170 175
 25 Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp
 180 185 190
 30 Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr
 195 200 205
 Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe
 210 215 220
 35 Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile
 225 230 235 240
 40 Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr
 245 250 255
 45 Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu
 260 265 270
 Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly
 275 280 285
 50 Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln
 290 295 300
 55 Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His
 305 310 315 320
 60
 65

ES 2 787 042 T3

Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu
 325 330 335

5 Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly
 340 345 350

10 Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met
 355 360 365

15 Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly
 370 375 380

20 Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr
 385 390 395 400

25 Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala
 405 410 415

30 Val Gly Lys Glu Phe Asn His Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn
 420 425 430

35 Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu
 435 440 445

40 Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser
 450 455 460

45 Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn
 465 470 475 480

50 Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp
 485 490 495

55 Asn Thr Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys
 500 505 510

60 Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys
 515 520 525

65 Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val
 530 535 540

70 Ala Ser Ser Leu Val Leu Val Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp
 545 550 555 560

75 Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565 570

80

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína de interés que comprende:
 - 5 a) tratar una planta o parte de una planta para aumentar la biomasa de hojas secundarias en donde el tratamiento comprende aumentar la duración de la luz durante el crecimiento de la planta, aumentar la intensidad de luz durante el crecimiento de la planta, cultivar la planta en presencia de una hormona, o una combinación de los mismos, para producir una planta o parte de la planta tratada;
 - 10 b) introducir uno o más de un ácido nucleico en la planta o parte de la planta tratada, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés, la secuencia de nucleótidos se encuentra unida operativamente a una región reguladora que es activa en la planta;
 - 15 c) incubar la planta o parte de la planta tratada en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés, para aumentar así el rendimiento de la proteína de interés, en comparación con el rendimiento de la proteína de interés obtenida del tejido vegetal de una planta similar que se cultiva en las mismas condiciones, pero que no se ha tratado para aumentar la biomasa de hojas secundarias
 - 20 en donde la etapa de tratamiento, etapa a), se realiza desde aproximadamente 40 días antes de la etapa de introducción, etapa b), hasta aproximadamente 9 días antes de la etapa de introducción, etapa b).
2. El método de la reivindicación 1, en donde en la etapa de tratamiento, etapa a), la planta o parte de la planta tiene una relación de biomasa de hojas secundarias respecto a biomasa de hojas primarias entre 0,2:1 y 3:1.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de tratamiento de la planta o parte de la planta, etapa a), se lleva a cabo desde aproximadamente 20 días antes de la etapa de introducción del uno o más de un ácido nucleico hasta 9 días antes del día de introducción del uno o más de un ácido nucleico.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, en donde la planta se cultiva en presencia de una hormona aproximadamente 9 días antes, aproximadamente 10 días antes, aproximadamente 11 días antes, aproximadamente 12 días antes, aproximadamente 13 días antes o aproximadamente 14 días antes de la etapa de introducción, etapa b), o en donde el aumento de la duración de la luz, o el aumento de la intensidad de luz se realiza al menos aproximadamente 20 días antes de la etapa de introducción, etapa b).
- 35 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una etapa d) de cosechar la planta o parte de la planta, o cosechar la planta o parte de la planta y purificar la proteína de interés.
6. El método de la reivindicación 5, en donde
 - 40 i) se cosechan tallos primarios y tallos secundarios,
se cosechan tallos secundarios, se cosechan hojas intermedias de tallos primarios (P2) y hojas jóvenes de tallos primarios (P1), o
 - 45 se cosechan hojas intermedias de tallos primarios (P2), hojas jóvenes de tallos primarios (P1), hojas viejas de tallos secundarios (S3), hojas intermedias de tallos secundarios (S2) y hojas jóvenes de tallos secundarios (S1), y
 - 50 ii) las hojas viejas (P3) de los tallos primarios de la planta se excluyen de la cosecha.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una proteína farmacéuticamente activa, un anticuerpo, un antígeno, una vacuna, una enzima o una enzima industrial.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una proteína hemaglutinina (HA) de influenza.
- 55 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde en la etapa de expresión, etapa c), el ácido nucleico se expresa de manera transitoria en la planta o parte de la planta, o el ácido nucleico se expresa de manera estable en la planta o parte de la planta.
- 60 10. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína de interés es una proteína hemaglutinina (HA) de influenza, en donde la planta o parte de la planta tratada produce una partícula similar a virus que comprende la proteína HA de influenza.
- 65 11. El método de la reivindicación 1, en donde el aumento en la biomasa de hojas secundarias es el resultado de un aumento en el número de tallos y hojas secundarios, un aumento en la longitud de los tallos y hojas secundarios,

o ambos.

12. El método de la reivindicación 1, en donde la hormona comprende una citoquinina o una citoquinina sintética.
- 5 13. El método de la reivindicación 12, en donde la citoquinina sintética es 6-bencilaminopurina (BAP).

Figura 1

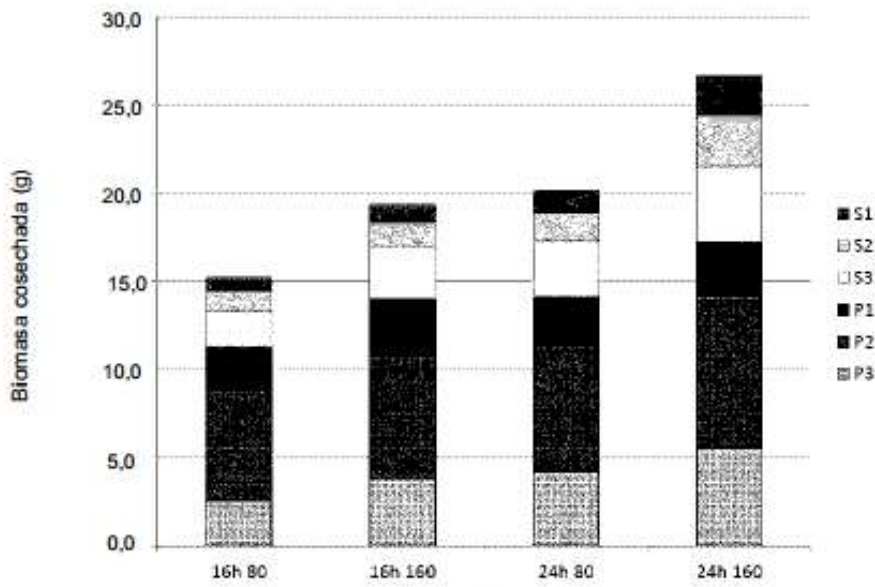


Figura 2

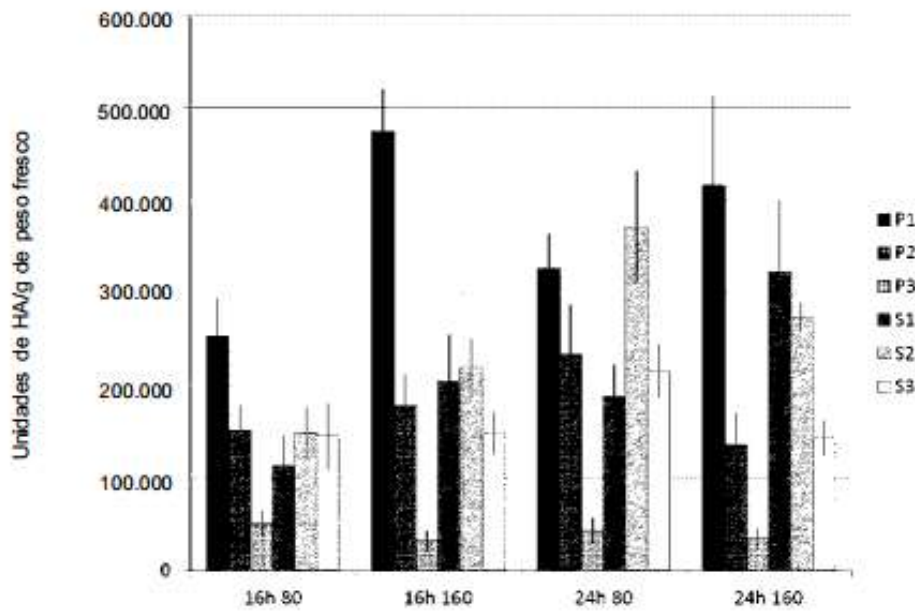


Figura 3

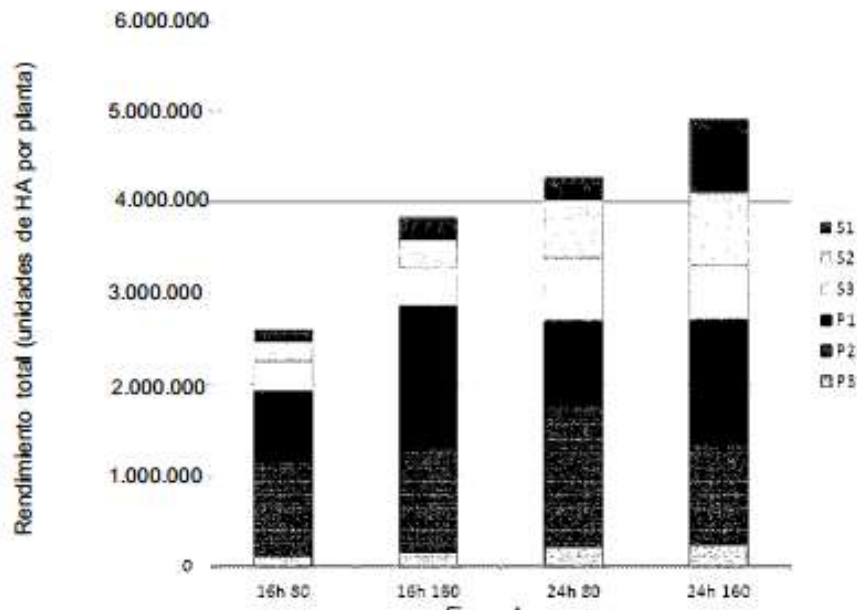


Figura 4

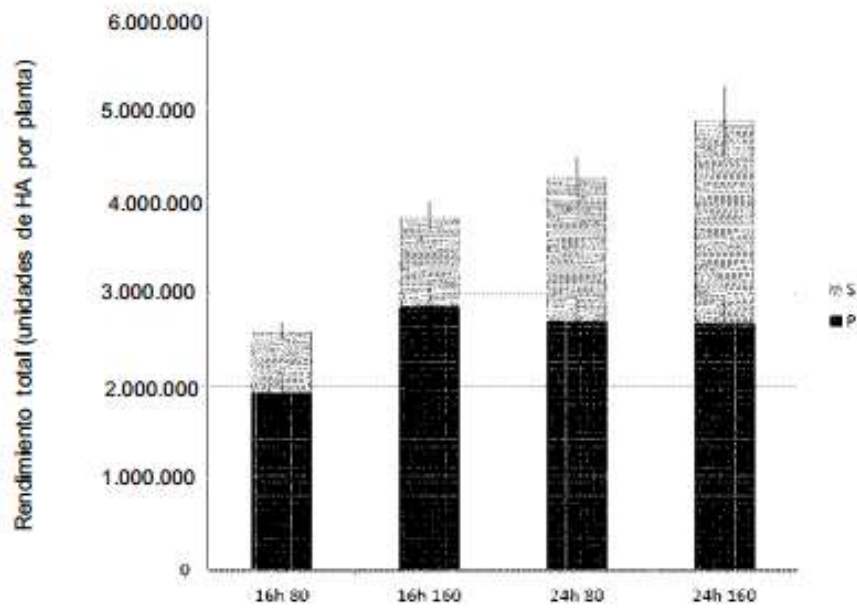


Figura 5

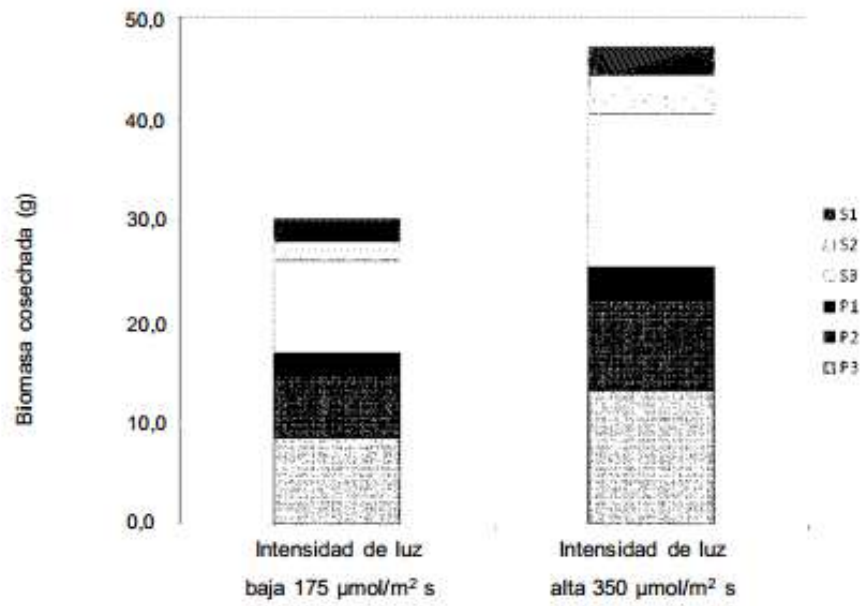


Figura 6

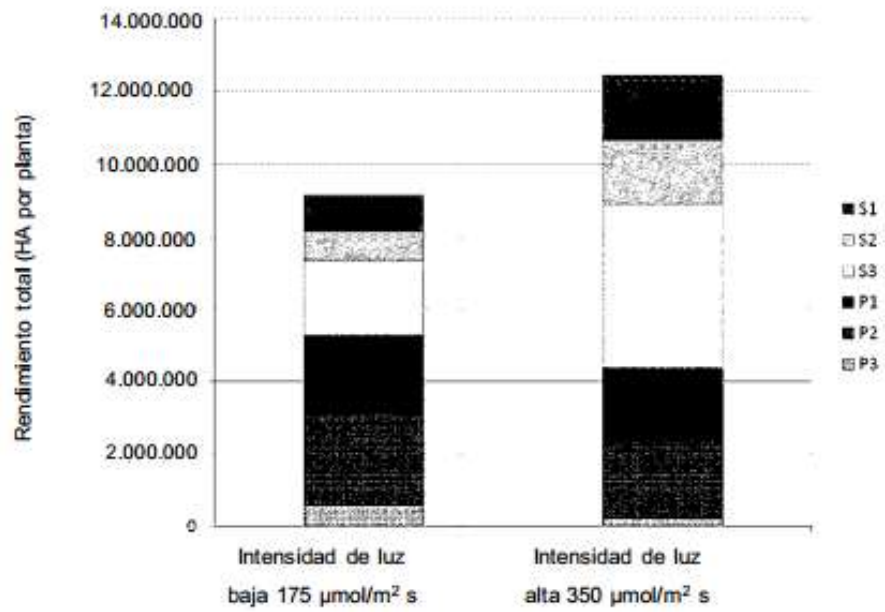


Figura 7

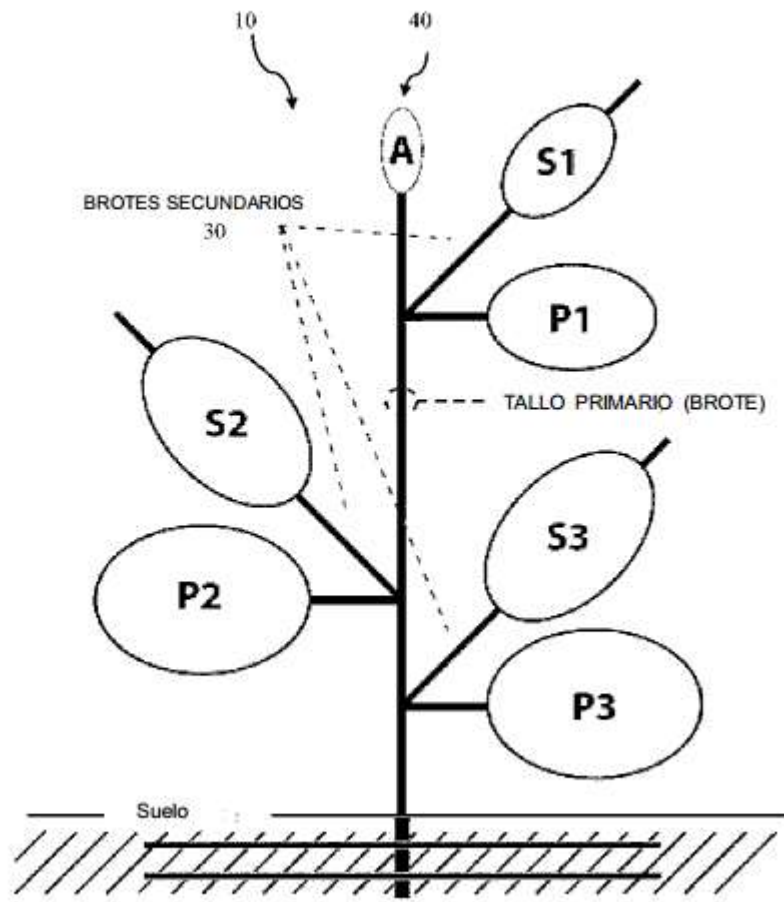


Figura 8

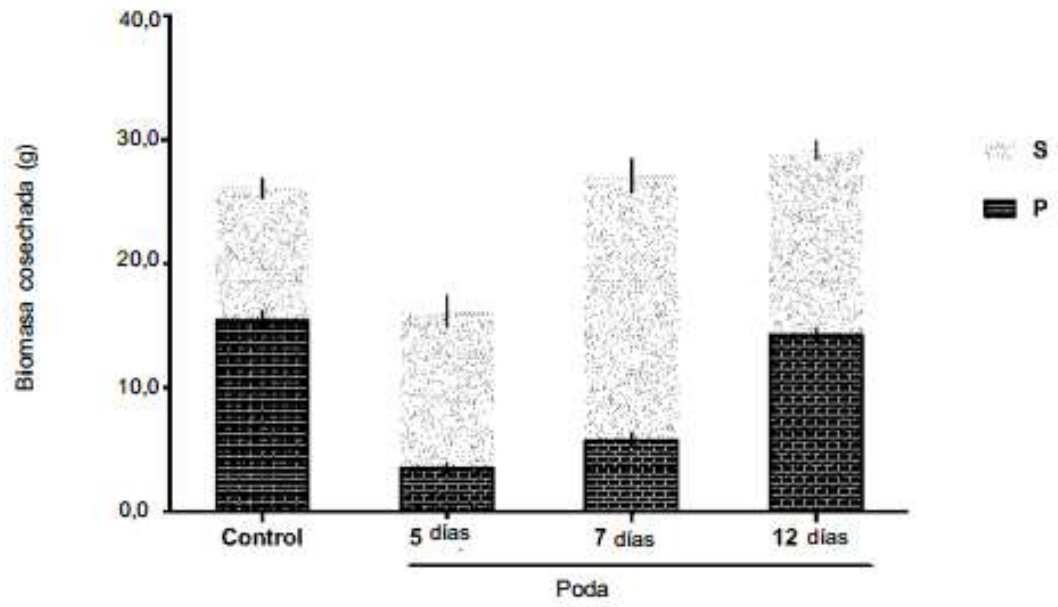


Figura 9A

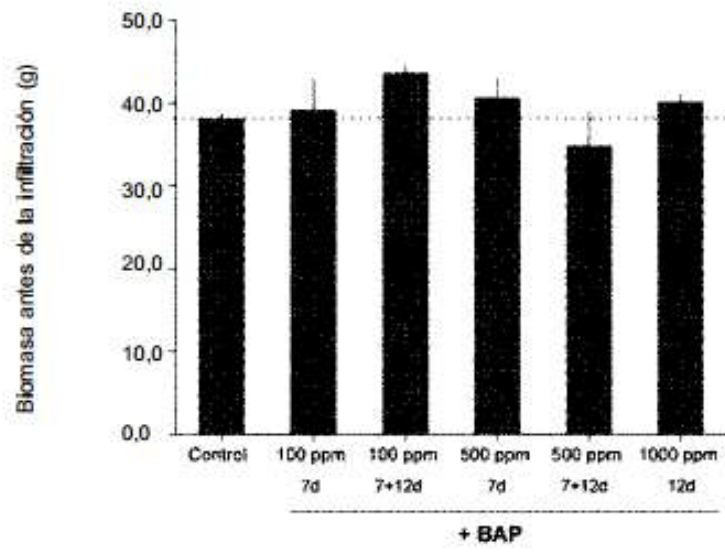


Figura 9B

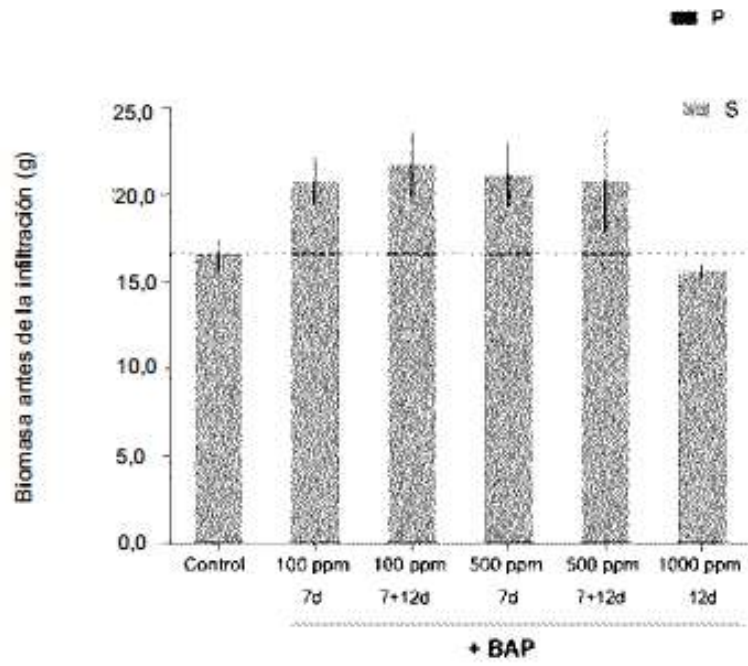


Figura 10

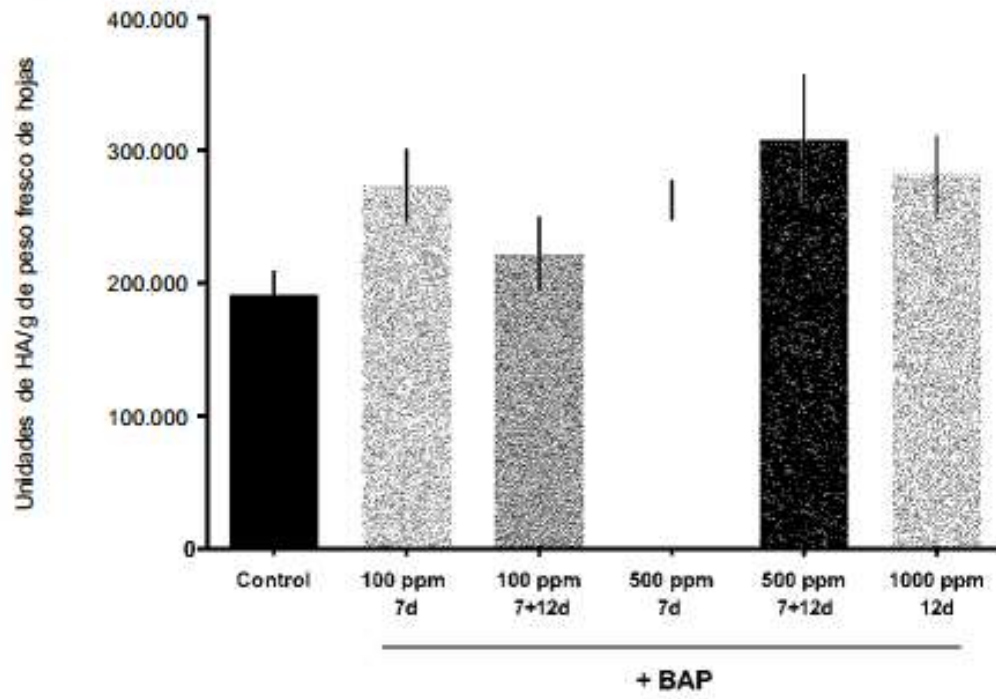


Figura 11

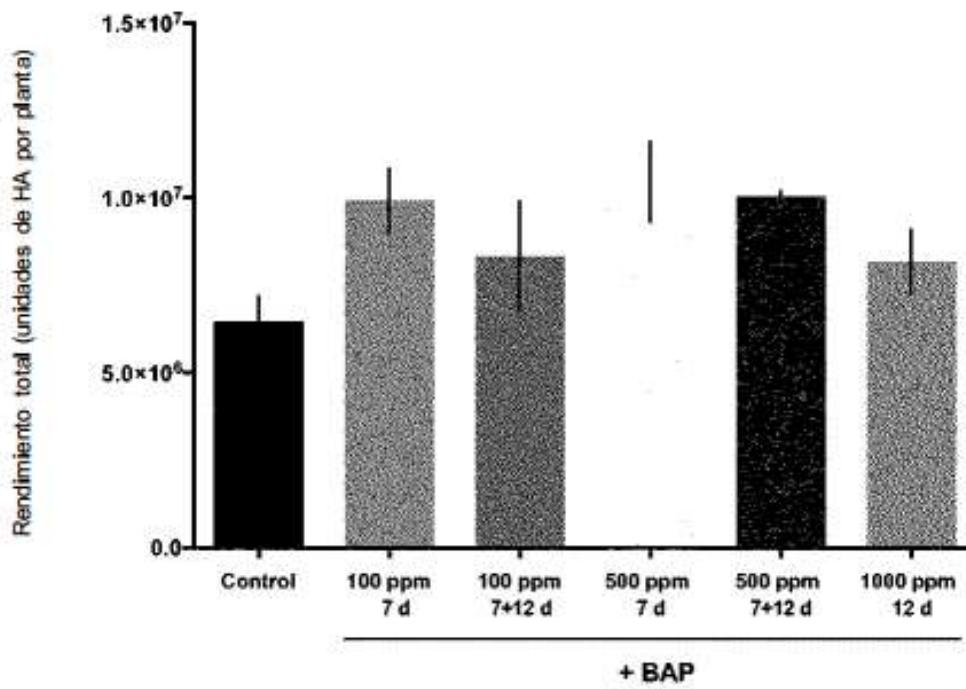


Figura 12: A-2X35S/CPMV-HT/PDISP/H3 Victoria/NOS (Construcción número 1391)

Figura 12A, IF-PDISP+3c; SEQ ID NO: 1

AAATTTGTCGGGCCCAIGGCGAAAAACGTTCGCAATTTTCGGCTTATIG

Figura 12B, IF-HicTMCT.SI-4r; SEQ ID NO: 2

ACTAAGAAAAATAGGCCTTTAAATACATATTCTACACTGTAGAGAC

Figura 13, Secuencia de nucleótidos de PDISP/H1 California; SEQ ID NO: 3

ATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTTTCTTGTGTTGGTTCCCTTCTCAGATCITTCGCTGACAC
 ATTATGTATAGGTTATCATGCGAACAAATTCACAGACACTGTAGACACAGTACTAGAAAAAATGTAACAGTAACAC
 ACTCTGTTAACCTTCTAGAAAGCAAGCATAACGGGAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGT
 AAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCTTACAT
 TGTGGAAACACCTAGTTCCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGATTTCAATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAAT
 TGAGCTCAGTGTATCATTTTGAAGGTTTGAGATATTCCTCCAAAGCAAGTTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAA
 GGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAA
 TTCATACCCAAAAGCTCAGCAAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCTCTCGTGTATGGGGCATTCAACCATC
 CATCTACTAGTGTGACCAACAAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGTTCATCAAGATACAGC
 AAGAAAGTTCAAGCCGGAAATAGCAATAAGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACATTTACTGGACACT
 AGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTGGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAA
 GAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAATACACAGTCCACGATTGCAATACAACCTGTCAAACACCCAAAGGT
 GCTATAAACACCCAGCCTCCCATTTTCAAGATATACATCCGATCACAATGGAAAATGTCCAAAATATGTAAAAAGCAC
 AAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATATCCCGTCTATTCAATCTAGAGGACTATTTGGGGCCATTGCGGGT
 TCATTGAAGGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTTATCACCATCAAAATGAGCAGGGGTGAGGATAT
 GCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTAATAACAAAGTAAATTTCTGTTATTGAAAAGATGAA
 TACACAGTTTACAGCAGTAGGTAAGAGTTCAACCACTGGAAAAAAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATG
 ATGGTTTCTGGACATTTGGACTTACAATGCCGAACGTGTTGGTTCTATTGGAAAATGAAAGAATTTGGACTACCAC
 GATTCAAATGTGAAGAATTATATGAAAAGGTAAGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATTTGAAAACGGCTG
 CTTTGAATTTTACCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAAGTGTCAAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACT
 CAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCG
 ATCTATTCAACTGTGGCCAGTTCATTGGTACTGGTAGTCTCCCTGGGGCCAAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGG
 GTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAA

Figura 14, Representación esquemática de la construcción 1191. Los sitios de enzimas de restricción SacII y StuI usados para la linealización del plásmido se anotan en la representación.

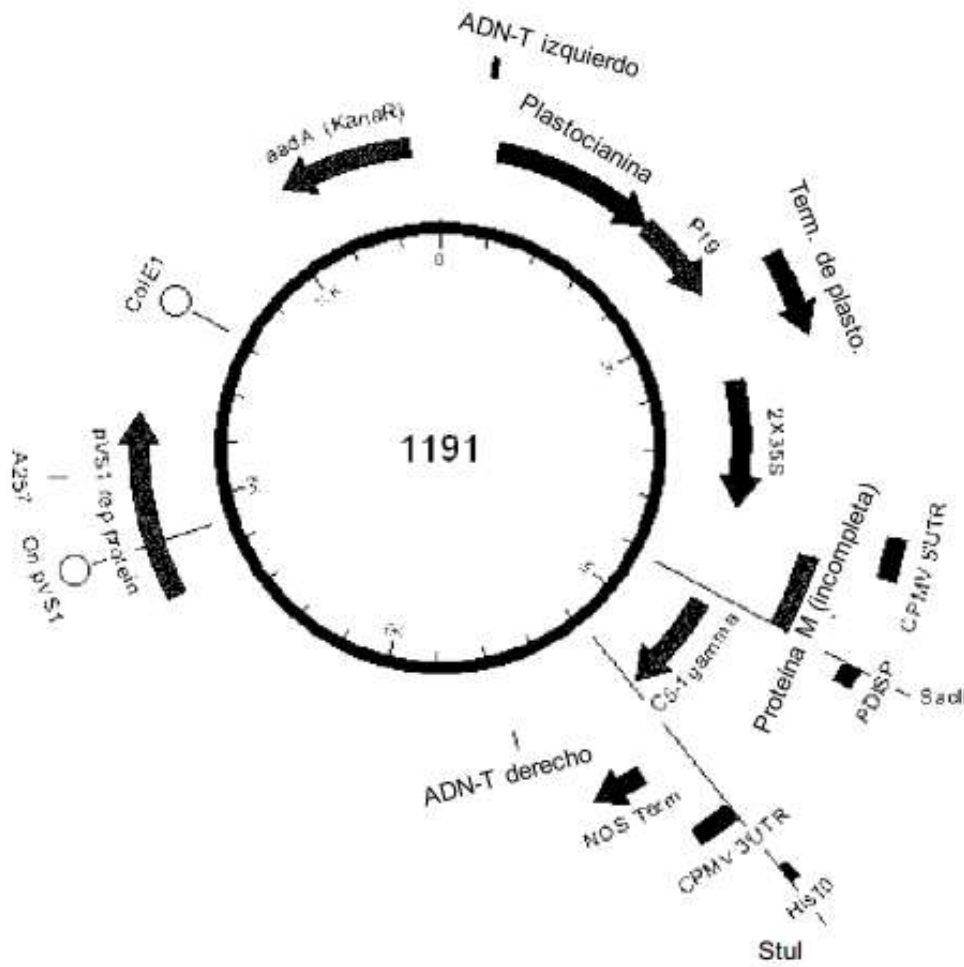


Figura 15, SEQ ID NO: 4 Construcción 1191 desde el límite izquierdo al derecho del ADN-t (subrayados). 2X35S/CPMV -HT/NOS con casete de expresión de plastocianina-P19-inhibidor de silenciamiento de plastocianina

TGGCAGGATATATTGTTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATGTACT
 GAATTAACGCCGAATCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAGTTTAAGTTAGCA
 AGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAACATTAGAGTAAAGAA
 ATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTGAGAAAATTTGTTGTCT
 CTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAGGAAGGGAGAAATAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAG
 AAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATATCATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAAATAAGGG
 TTAATTGCTGTAATAAATAAGGATGACGCATTAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTTGGCAAGTCATTAAAAAG
 AAAGAATAAATATTTTTAAAATTAAGGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGA
 GTTGGATTAAAGTTGTATTAGTAATAGAAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCCTATATATTGC
 CCCATAGAGTCAGTTAACTCATTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA
 AAAAAAACGGTATATTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGATAACATCCA
 ATCCAACCAATCACAACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCCACGCATCTGTGGCACATCTACATTATCTAA
 ATCACACATTCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTTATCACCCATTCTATAAAAAATCACA
 CTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCTTCAAACACATACAAAGAGAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAG
 AGAAAATGGAACGAGCTATCAAGGAAACGACGCTAGGGAAACRAAGCTAACAGTGAACGTTGGGATGGAGGATCAGGA
 GGTACCCTTCTCCCTCAAACCTTCTGACGAAAGTCCGAGTTGGACTGAGTGGCGGTACATAACGATGAGACGAA
 TTCGAATCAAGATAATCCCCTTGGTTTCAAGGAAAGCTGGGGTTTCGGGAAAGTTGTATTTAAGAGATATCTCAGAT
 ACGACAGGACGGAAGCTTCACTGCACAGAGTCTTGGATCTTGGACGGGAGATTGGTTAACTATGCAGCATCTCGA
 TTTTTCGGTTTCGACCAGATCGGATGTACCTATAGTATTTCGGTTTCGAGGAGTTAGTATCACCGTTTCTGGAGGGTC
 GCGAATCTTCAGCATCTCTGTGAGATGGCAATTCGGTCTAAGCAAGAAGTGTACAGCTTGCCCCAATCGAAGTGG
 AAAGTAATGTATCAAGAGGATGCCCTGAAGTACTCAAACCTTCGAAAAGAAAGCGAGTAAAGTTAAAATGCTTCTT
 CGTCTCCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTATG
 AAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAGAATGTTTCTC
 CATAACTAACTAGACATGAAGACCTGCCCGTACAATTTGCTTATATTTGAACAACATAAAATGAACATCTTTTGGC
 ACAACTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAAGTTCAATAGATTAAATAATGGAAATATCAGTTATCG
 AAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAACACTAATTTTATATCATCCCCTTTGATAAATGATAGTACACCAA
 TTAGGAAGGAGCATGCTCGCTAGGAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTGCAAGCTGCTTAGCCGTGATGCCAA
 TACGCAAAACCGCTCTCCCGCGGCTTGGGAATTAAGCCGCTGTCGACAAAGCTTGCATGCCGGTCAACATGGTGG
 AGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAA
 CAAAGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCATTGCCCAGCTATCTGTCATTTATTGTGAAGATAGTGGAAAA
 GGAAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTC
 CCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGAGCTTCCAACCACGCTCTCAAAGCAAGTGGAT
 TGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAG
 GGCAATGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCATTGCCCAGCTATCTGTCATTTA
 TTGTGAAGATAGTGGAAAAAGGAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGAT
 GCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCAGGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAGACGTTCCAACCAC
 GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAG
 ACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGTAATAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACG
 TGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCTCTTGTCTTTCTTG
 CGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGATCGTGTCTCGGCACCCAGTACAACGTTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAG
 ATCTCTTTGTGGACACGTAGTGGCGGCCATTAATAACGTGTAATTTGTCCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAA
 AAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTTCTGCTGACTTTCCGGCGGTGCAAT
 ATCTCTACTTCTGCTGACGAGGTATTGTTGCCGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGATTGGTTCTATAAGAAA
 TCTAGTATTTCTTTGAAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATCT
 GCCCAAATTTGTGGGCCCCGGATGGCGAAAAACGTTGCGATTTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTGTGTTGGTT
 CTTTCTCAGATCTTCGCTGCAGGCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTG
 CTGCCAAAACCTAATCCATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGG
 AACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTC
 AGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCCGGCCAGCAGCACAAGG
 TGGACAAGAAAATTTGCCCCAGGATTTGGTTGTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCT
 ATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACAGTGTGTTGTTGGTACACATCAG
 CAAGGATGATCCCGAGTCCAGTTACAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCCAACCCGGG

Figura 15 cont.

AGGAGCAGTTC AACAGCACTTCCGGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAG
CGATCGCTCACCAICACCATCACCATCACCATCACCATTAAAGGCCATATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTATTC
GGTGGCATTTCTATGTTGGTGAGCGGTTTCTGTGCCAGAGTGTGTTAATTTATGTAATTAATTTCTTTGTG
AGCTCCGTTTAGCAGGTCTGTCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTAATTTATTAIAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
ACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTCTTAAGATGAAATC
CTGTGGCCGGTCTTGGCATGATTATCAATAAATTTCTGTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATAACATGTAATGC
ATGACGTTATTTAGAGATGGGTCTTTATGATTAGAGTCCCGCAATATAACATTAATACCGGATAGAAAACAAAAT
ATAGCGCGCAAAC TAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGAGTCTCAAGCTTGGCG
CGCCACGTGACTAGTGGCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTACCCCAACTTAAT
CGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTT
GCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATGTCTGTTCCCGCCTTCAGTTAAACTAT
CAGTGTTTGACAGGATATATGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTA

Figura 16, SEQ ID NO: 5

Casete de expresión número 484 del promotor 2X35S al terminador NOS. La secuencia de nucleótidos de PDISP/H1 California está subrayada.

GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCAAT
 TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCTTATTGTGA
 AGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGGGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCT
 GCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAAGACGTCCAACCCAGTCTTC
 AAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCT
 CAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCT
 ATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGGGATAAAGGAAAGGC
 CATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAAG
 ACGTTCCAACCCAGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCAC
 TATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGTATTAATACTTAATAGGTTTTG
 ATAAAAGCGAACGTGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTAACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTCTCT
 CTTGTCTTTCTTGGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTGAGATCGTGTTCGGCACCAAGTACAACGTTTTCTTTCACTGA
 AGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACAGTAGTGGCGGCCATTAAATAACGTGTAAGTGTACTTGTCTTATTCTTGT
 GTGGTCTTGGGAAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGTCTGTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGTCTGACTTT
 CGCGGGGTGCAATATCTCTACTTCTGTCTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTGTCTGATTG
 GTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGC
 TTCTGTATATCTGCCCAAATTTGTGGGCCCATGGCGAAAAACGTTGGCATTTCGGCTTATTGTTTTCTCTTCTT
 GTGTGGTCTCTCTCAGATCTTCTGCTGACACACTTGTATAGCTTATCATGCGAACAAATCAACAGACACTGTAGA
 CACAGTACTAGAAAAGAAATGTAACAGTAACACACTTGTATAACCTTCTAGAAGACAAGCATAACGGGAAACTATGCA
 AACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAA
 TCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCTTACATTGTGGAAACACCTAGTTCAGACAAATGGAACGTGTTACCCAGGAGA
 TTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTGCATCATTTGAAAGGTTTGGAGATATCCCAAGA
 CAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGTCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTAC
 AAAAAATTAATAATGGCTAGTTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAA
 AGAAGTCTCTGTCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATG
 CATATGTTTTTGTGGGTCATCAAGATACAGCAAGAAGTTCRAAGCCGGAAATAGCAATAAGAACCCAAAGTGGGGAT
 CAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACACTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTTCGAAGCAACTGGAAATCT
 AGTGGTACCGAGATATGCATTGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACACCAGTCCACG
 ATTGCAATACAACCTGTCAAACACCCAAAGGTGCTATAAACACCCAGCCTCCCATTCAGAATATACATCCGATCACA
 ATTGGAAAATGTCCAAAATATGTA AAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATATCCCGTCTATTCA
 ATCTAGAGGACTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTTATTGAAAGGGGGTGGACAGGGATGGTAGATGGATGGTACGGTT
 ATCACCATCAAAATGAGCAGGGGTGAGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACACAGAATGCCATTGACGAGATTACT
 AACAAAGTAAATCTGTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCAGTAGGTAAGAGTTCAACCACCTGGAAAA
 AAGAATAGAGAATTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTTCTGGACATTGGACTTACAATGCCGAACGTGGTTTC
 TATTGGAAAATGAAAGAACTTTGGACTACCACGATTCAAATGTGAAGAAGTTATGAAAAGGTAAGAAGCCAGCTA
 AAAAAAATGCCAAGGAAATTTGGAAACGGCTGCTTTGAATTTTACCACAAATGGGATAACACGTGCATGGAAAAGTGT
 CAAAATGGGACTTATGACTACCCAAAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGC
 TGGAAATCAACAAGGATTTACCAGATTTTGGCGATCTATTCAACTGTCCGACGTTCAATGGTACTGGTAGTCTCCCTG
 GGGCAATCAGTTTCTGGATGTGCTCTAATGGGTCTCTACAGTGTAGAATATGTATTTAAAGGCCTATTTCTTTTAG
 TTTGAATTTACTGTTATTGGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGGAGGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTAT
 GTAATTTAATTTCTTGTGAGCTCCTGTTTACGAGGTCCTCCTTCAGCAAGGACACAAAAGATTTTAAATTTTATT
 AAAAAAAGAAAAAAGACCGGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAA
 AGTTTCTTAAGATGAAATCCTGTTGCCGGTCTTGGGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGT
 AATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAAT
 ACCGATAGAAAAAATAATAGCGCGCAAACTAGGATAAATPATCGCGCGGTGTGCATCTATGTTACTAGAT

Figura 17, SEQ ID NO: 6

Secuencia de aminoácidos de PDISP/H1 California.

YAKNVAIFGLLPSELLVLPFSQIFADILCIGYHANNSTDTVDIVLEKNVIVIESVNLLEDKENGKLCRLRQVAPLELG
 KONIAGMILGNFECEESLSTASSNSYIVETPSSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNK
 GVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKQKEVLLVWGHEPSTISADQQSLYQNADAYVFGSSRYS
 KKFKPEIAIRPKVVDQEGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMERNAGSGIISDTPVHDCNTTCQTPKG
 AINTSLPFQNIIEPTIGKCPKYVKSICKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWIGMVDGWYGYEHQNEQGSY
 AADLKSTQNAIDELTNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNLEKRIENLNKKVDDGFLDIWYNAELLVLENERLTDYE
 DSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKDNTCYESVXNGTYDYPKYSEBAKLNREIBDGVKLESTRICYILA
 CYSTVASSLVLVVSLGAISFWMCNGLQCRICI*

Figura 18, Representación esquemática de la construcción número 484 (2X35S/CPMV HT)

